

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



ANÁLISIS DE FUNCIONES DE
Salmonella enterica
QUE RESPONDEN AL ESTADO DE NO
PROLIFERACIÓN EN EL INTERIOR DE
FIBROBLASTOS

TESIS DOCTORAL

LORENA DOMÍNGUEZ ACUÑA

Madrid 2012

Memoria presentada por Lorena Domínguez Acuña para optar
al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de
Madrid.

Director de Tesis

Dr. Francisco García del Portillo

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda para la Formación de Personal Investigador (BES-2008-004848) concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad.

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.”

Isaac Newton

“La constancia no está en empezar, sino en perseverar”.

Leonardo Da Vinci

A mis padres

A Daniel

AGRADECIMIENTOS

Un momento complicado de mi vida fue cuando decidí cambiar de área de investigación. En ese momento el Dr. Francisco García del Portillo confió en mí invitándome a formar parte de su grupo. Gracias Paco, por apostar por mí y ofrecerme otra oportunidad aun conociendo las limitaciones que se nos presentaban.

A mi tutora, Graciela, por su disposición a ayudarme cuando lo he necesitado, por sus consejos y por darme la oportunidad de entrar en contacto con el mundo de la docencia.

Quiero agradecer también a aquellas personas del BiMi que me han ayudado durante estos años y a los buenos amigos que he conocido durante mi estancia en el CNB.

Por supuesto, a todos los compañeros con los que he coincidido en el 28o: Cristina, Valentina, Laura F., Fátima, Pilar, Javier, Natalia, Laura B., Jesús, Diana, Gadea, Laura N., Dimitri, Álvaro, Romy, Ana, Juan, Estel, Virginia, Pablo y Juan Luis. Podría escribir otra tesis sólo para agradecerles todo lo que me han aportado estos cuatro años. A Javier, “Mariscotillo”, gracias por ser mi guía durante los primeros años, por tener siempre una respuesta a mis mil preguntas y responder siempre con una sonrisa. Querida Nat: gracias por tus maravillosos “polvitos mágicos”, por tus divertidas hipótesis y por estar siempre dispuesta a ayudar a los demás. “Al Juan-gue”, por enriquecerme con sus conocimientos en Biología Molecular. A mi “Dianina”, gracias por tu importante apoyo técnico y por tus divertidas ocurrencias, ¡aunque a veces haya tenido que vigilar mis espaldas! A Gadeita, por poner el punto práctico a las cosas. A Lau, que junto con Jesi, se han convertido en mi referente de buena madre. A Álvaro, “Pimidus primidii”, gracias por ser mi “profe” de estadística, por enseñarme que puede haber una forma mejor de hacer las cosas y por ayudarme a confiar un poco más en mí misma. A Romy, por los momentos de “un rayo de sol” en la poyata. A Ana, por las risas en las taquillas. A Estel, Virginia y Juanjo por los divertidos momentos que hemos compartido en el último año. A ellos y a todos los demás, gracias por compartir conmigo buenísimos momentos dentro y fuera del laboratorio y por haberme hecho empezar cada día con una sonrisa.

Por supuesto a Daniel. Muchas gracias por ayudarme en temas de bioinformática-informática, por concederme todos los “caprichitos”, por tu apoyo e infinita paciencia y, sobre todo, por enseñarme a aprender. Has sido el gran pilar en el que sostenerme estos años. Gracias, sigo aprendiendo contigo.

Por último, quiero agradecer a mis padres y mis hermanos. Gracias por la educación que me habéis dado, por ofrecerme vuestro apoyo y ayuda incondicional y por hacerme desconectar en vacaciones. Sencillamente os debo a vosotros el haber llegado hasta aquí. Os quiero.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN (en inglés).....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
El género <i>Salmonella</i> . Taxonomía.....	3
Interacción de <i>Salmonella</i> con el hospedador en modelos de ratón.....	4
Interacción de <i>Salmonella</i> con distintos tipos celulares del hospedador.....	5
Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de células epiteliales.....	6
Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de células fagocíticas.....	7
Comportamiento de <i>Salmonella</i> en el interior de fibroblastos.....	8
Estudios de carácter global del proceso de infección causado por <i>Salmonella</i>	9
Adaptación de <i>Salmonella</i> al estilo de vida intracelular. La escasez de hierro.....	11
Principales vías de adquisición de hierro en <i>Salmonella</i>	12
Regulación de los sistemas de adquisición de hierro.....	17
Importancia del hierro en la interacción patógeno-hospedador.....	19
OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Material biológico.....	31
Estirpes bacterianas y plásmidos.....	31
Bacteriófagos.....	31
Anticuerpos.....	31
Líneas celulares eucariotas.....	31
Medios y condiciones de cultivo.....	31
Cultivo de bacterias.....	31

Cultivos de células eucariotas.....	33
Genética bacteriana.....	33
Inactivación de genes cromosómicos de <i>Salmonella</i>	33
Etiquetado de proteínas de <i>Salmonella</i>	34
Construcciones genéticas mediante el protocolo con el plásmido pKO3 Blue.....	34
Electroporación de <i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i>	34
Preparación de lisados de bacteriófagos P22.....	35
Transducción en medio líquido.....	36
Manipulación de ácidos nucleicos.....	36
Extracción de ADN genómico.....	36
Extracción de ADN plasmídico.....	36
Extracción de ARN.....	37
Digestión y ligación de fragmentos de ADN.....	37
Electroforesis en geles de agarosa.....	37
Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	37
Reacción en cadena de la polimerasa.....	38
Secuenciación.....	38
Secuenciación del ADN.....	38
Análisis y comparación de secuencias.....	38
Infección de cultivos celulares con <i>Salmonella</i>	38
Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación intracelular.....	38
Obtención de bacteria intracelular en ensayos de infección de células eucariotas.....	39
Preparación de extractos de proteínas.....	40
Proteínas totales de <i>Salmonella</i> en medios de cultivo.....	40
Proteínas totales de <i>Salmonella</i> intracelular.....	40
Inmunodetección de proteínas (ensayos de “Western Blot”).....	40

Microscopía de inmunofluorescencia.....	41
Análisis de los datos de transcriptómica.....	41
Análisis estadísticos.....	42
RESULTADOS.....	45
CAPÍTULO 1. Búsqueda de funciones de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium que contribuyen al estado no proliferativo intracelular en fibroblastos.....	47
1.1 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular en la condición de no crecimiento (Grupo I).....	53
1.2 Análisis de genes inducidos más de tres veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular en la condición de no crecimiento (Grupo II).....	58
1.3 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular y reprimidos más de cuatro veces en el mutante <i>phoP</i> y en la estirpe silvestre extracelular (Grupo III).....	58
1.4 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces en la estirpe silvestre y el mutante <i>phoP</i> durante la infección de fibroblastos NRK-49F (Grupo IV).....	60
CAPÍTULO 2. Requerimientos nutricionales de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium en el ambiente intravacuolar.....	63
2.1 Expresión de los transportadores de NAcGlc de <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de fibroblastos.....	65
2.2 Análisis de la captación del hierro por <i>S. Typhimurium</i> en el interior de fibroblastos.....	67
2.2.1 Efecto de la suplementación de hierro sobre el estado no proliferativo de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos.....	67
2.2.2 Estudio de los transportadores de hierro de <i>S. Typhimurium</i> en infección de fibroblastos NRK-49F y células epiteliales HeLa.....	73
2.2.3 Estudio de la síntesis de transportadores de hierro de <i>S. Typhimurium</i> en infección de fibroblastos NRK-49F y células epiteliales HeLa.....	82
2.2.4 Procesamiento del transportador de membrana externa FepA en la bacteria intracelular.....	87

DISCUSIÓN.....101

 Funciones de *S. Typhimurium* involucradas en la adaptación al estado no prolifera-
 tivo en el interior de fibrolastos.....103

 Requerimientos nutricionales de *S. Typhimurium* en el fibroblasto: fuentes de car-
 bono alternativas.....105

 Requerimientos nutricionales de *S. Typhimurium* en el fibroblasto: el transporte de
 hierro.....105

 Procesamiento intracelular del transportador de catecolatos FepA de *S. Typhimu-
 rium* en fibrolastos.....110

CONCLUSIONES.....117

BIBLIOGRFÍA.....123

ANEXO I.....137

ANEXO II.....151

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Principales vías de adquisición de hierro de <i>S. Typhimurium</i>	14
Figura 2. Esquema de las diferentes condiciones de crecimiento comparadas en los estudios de globales de expresión génica de <i>S. Typhimurium</i>	50
Figura 3. Distribución de genes inducidos más de cuatro veces ($M \geq 2$) comunes y específicos de las condiciones descritas en la figura 1 (A, B y C).....	50
Figura 4. Los mutantes $\Delta STM4466-STM4467$ y $\Delta aidB$ de <i>S. Typhimurium</i> presentan cambios en la invasión y/o proliferación en fibroblastos.....	54
Figura 5. Los mutantes $\Delta STM4466-STM4467$ y $\Delta aidB$ de <i>S. Typhimurium</i> alcanzan un número de bacteria intracelular a 24h similar a la estirpe silvestre.....	55
Figura 6. La carencia de los genes <i>STM0279</i> y <i>STM1020</i> provoca cambios en la invasión y/o proliferación intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos.....	56
Figura 7. La ausencia de los genes <i>STM4466-STM4467</i> y <i>aidB</i> no altera la morfología, localización ni la tasa de proliferación intracelular de <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de fibroblastos NRK-49F.....	57
Figura 8. La carencia de los genes <i>yhck</i> e <i>yhjV</i> no afecta a la invasión ni a la proliferación de <i>S. Typhimurium</i> en el interior de fibroblastos.....	58
Figura 9. La carencia de genes del grupo III no afecta a la invasión ni a la proliferación de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos.....	59
Figura 10. Los mutantes del grupo IV no presentan diferencias significativas en la invasión ni la proliferación de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos.....	58
Figura 11. Expresión de la proteína ChiQ de <i>S. Typhimurium</i> en medio LB.....	66
Figura 12. Control de la síntesis de las proteínas ChiP y ChiQ de <i>S. Typhimurium</i> por el sRNA ChiX en bacteria extracelular e intracelular.....	67
Figura 13. Expresión de los genes relacionados con el transporte de hierro en la estirpe silvestre y en el mutante <i>phoP</i> de <i>S. Typhimurium</i>	68
Figura 14. La tasa de proliferación intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos aumenta al añadir hierro al medio de celular.....	69
Figura 15. La suplementación del medio de células eucariotas con hierro aumenta el número de bacteria intracelular en fibroblastos pero no en células epiteliales.....	70

Figura 16. Esquema básico de los sistemas de adquisición de hierro descritos en <i>S. Typhimurium</i>	73
Figura 17. La carencia de los transportadores FepCGD, FepA, IroN y CirA retrasa el crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en placa.....	74
Figura 18. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB provoca un retraso del crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en placa.....	75
Figura 19. La velocidad de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en medio LB líquido se ve afectada por la carencia del transportador FepCGD.....	76
Figura 20. La carencia de un único transportador de hierro no afecta a la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en fibroblastos NRK-49F.....	77
Figura 21. La supervivencia intracelular de los mutantes $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ y $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ $\Delta fepCGD$ de <i>S. Typhimurium</i> se ve afectada en fibroblastos.....	78
Figura 22. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC y FepCGD provoca una disminución en el número de bacterias intracelulares en fibroblastos.....	79
Figura 23. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB no afecta a la supervivencia intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en células epiteliales HeLa.....	80
Figura 24. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB altera mínimamente el número de bacterias intracelulares en células epiteliales HeLa.....	81
Figura 25. La ausencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB no afecta a la viabilidad de <i>S. Typhimurium</i> en medio LB carente de hierro.....	83
Figura 26. Niveles de las proteínas IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD de <i>S. Typhimurium</i> intracelular en fibroblastos NRK-49F.....	84
Figura 27. Niveles de las proteínas IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD de <i>S. Typhimurium</i> intracelular en células epiteliales HeLa.....	85
Figura 28. Niveles de las proteínas etiquetadas FepA y Fur de <i>S. Typhimurium</i> en presencia o ausencia de hierro.....	86
Figura 29. Procesamiento de la proteína etiquetada FepA de <i>S. Typhimurium</i> intracelular en fibroblastos NRK-49F.....	87

Figura 30. El procesamiento de FepA tiene lugar exclusivamente en la bacteria intracelular en el estado no proliferativo.....88

Figura 31. Representación de la estructura secundaria y estructura tridimensional del transportador de membrana externa FepA.....89

Figura 32. Configuración de las variantes etiquetadas del transportador de membrana externa FepA de *S. Typhimurium*.....90

Figura 33. Procesamiento de las variantes de la proteína FepA etiquetadas con los epitopos FLAG y HA o carentes del dominio “tapón”91

Figura 34. Las variantes de la proteína FepA etiquetadas con los epitopos FLAG y HA o carentes del dominio “tapón” muestran pérdida de funcionalidad.....93

Figura 35. La carencia de función de FepA no altera la capacidad de *S. Typhimurium* de sobrevivir en fibroblastos y células epiteliales HeLa.....94

Figura 36. La viabilidad del mutante $\Delta degS$ se ve afectada durante el crecimiento en LB con DTPA.....95

Figura 37. La proteasa DegS es importante para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos.....96

Figura 38. Pérdida de la integridad celular del mutante $\Delta degS$ de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos NRK-49F.....97

Figura 39. DegS y RpoE están involucrados en el procesamiento intracelular de la proteína FepA de *S. Typhimurium*.....98

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Genes seleccionados a partir de los grupos I, II, III, IV que fueron delecionados para el posterior análisis de mutantes en el modelo de fibroblastos.....	52
Tabla 2. Número de genes seleccionados en los grupos I, II, III, IV y número de mutantes generados en cada uno de ellos.....	53
Tabla 3. Niveles de expresión de los genes <i>sohB</i> y <i>degS</i> de <i>S. Typhimurium</i>	95

LISTADO DE TABLAS EN ANEXOS

Tabla A1. Estirpes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 1 de resultados.....	139
Tabla A2. Estirpes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 2.1 de resultados.....	140
Tabla A3. Estirpes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 2.2 de resultados.....	140
Tabla A4. Estirpes de <i>E. coli</i> empleadas en este trabajo.....	141
Tabla A5. Plásmidos empleados.....	142
Tabla A6. Oligonucleótidos empleados en la disrupción de genes cromosómicos.....	143
Tabla A7. Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de genes cromosómicos...	148
Tabla A8. Genes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium del grupo I.....	154
Tabla A9. Genes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium del grupo II.....	155
Tabla A10. Genes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium del grupo III.....	156
Tabla A11. Genes de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium del grupo IV.....	157

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC	"ATP-binding cassette"
ADI	Arginina desiminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DHBS	2,3-dihidroxibenzoil serina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMT1	Transportador de metales divalentes
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
DTPA	Ácido dietilén-triamino-pentaacético
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
Ent	Enterobactina
FLAG	Epítipo FLAG
GDHBS	2,3-dihidroxibenzoil serina glucosilada
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Hemoaglutinina
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IROMP	Proteínas de membrana externa reguladas por hierro
kb	kilobases
LB	Medio de cultivo Luria y Bertani
Lcn2	Lipocalina 2
Lgp	Glicoproteínas lisosomales
LIP	Reserva de hierro lábil ("Labile iron pool")
LPS	Lipopolisacárido
Mb	Megabases
MEM	Medio mínimo esencial
NAcGlc	N-Acetilglucosamina
NO	Óxido nítrico
NRK-49F	Fibroblastos de riñón de rata ("normal rat kidney fibroblasts")
p. i.	post-infección
PBS	Solución tamponada fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Base de datos de proteínas ("Protein Data Base")

RNI	Intermediarios de nitrógeno reactivo ("reactive nitrogen intermediate")
ROI	Intermediarios de oxígeno reactivo ("reactive oxygen intermediate")
ROS	Especies reactivas del oxígeno ("reactive oxygen species")
RT	Transcripción reversa
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> (" <i>Salmonella</i> -containing vacuole")
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
Sifs	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> (" <i>Salmonella</i> -induced filaments")
SPI-1	Isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i>
SPI-2	Isla de patogenicidad 2 de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción de tipo 3
TCA	Ciclo de los ácido tricarboxílicos
TfR-1	Receptor de la transferrina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
ufc	Unidad formadora de colonia

SUMMARY

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a facultative intracellular bacterial pathogen that causes disease to a wide range of hosts. In vitro infection models have shown that, upon infection of epithelial cells or macrophages, *S. Typhimurium* proliferates extensively. This behavior contrasts to the situation observed in fibroblasts, in which *S. Typhimurium* remains in an intracellular non-proliferative state. The observed situation in the host tissues is similar to the fibroblast-*S. Typhimurium* interaction, regarding the average number of bacteria (3-4 individuals) observed per infected cell. The mechanisms involved in the maintenance of this non-proliferative state are yet unknown. One of the aims of this work was to clarify which are the genes involved in the adaptive process to the non-proliferative state used by *S. Typhimurium* located inside fibroblasts. Based on the analysis of the transcriptional profile of *S. Typhimurium* in the fibroblast infection model, we selected 124 genes that were up-regulated only in non-growing intracellular bacteria. Mutants lacking 35 of those genes were tested for invasiveness and intracellular proliferation during fibroblasts infection. The lack of a strong phenotype in this type of studies corroborated the high functional redundancy in metabolic and signaling factors previously reported for *S. Typhimurium*.

We have also attempted to elucidate the nutritional requirements that non-growing *S. Typhimurium* encounters in the vacuole that inhabits inside fibroblasts. Our results show that disaccharides containing N-acetylglucosamine, derived from probable source as host glycoproteins, are probably not employed by the pathogen as a carbon source during the infection of fibroblasts. Otherwise, the intracellular phagosomal environment is scarce on iron and *S. Typhimurium* may cope with this limitation by synthesizing iron transport systems. The supplementation of the cellular medium with iron resulted in increased proliferation of *S. Typhimurium* inside NRK-49F fibroblasts. Such increase was however not observed during *S. Typhimurium* infection of epithelial HeLa cells. Our results also suggest that *S. Typhimurium* preferentially employs ferrous ion uptake systems during the fibroblasts infection. In contrast, *S. Typhimurium* does not depend on ferrous ion uptake to survive inside HeLa cells. Our results also indicate that the catecholate transport protein FepA is cleaved exclusively during the non-proliferative state of *S. Typhimurium* infection. The protease DegS and the alternative sigma factor RpoE seem to be implicated on this proteolytic event.

INTRODUCCIÓN

EL GÉNERO *Salmonella*. TAXONOMÍA.

El género *Salmonella* se clasifica dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentra filogenéticamente próximo a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*. Estas bacterias son Gram-negativas, móviles, anaerobias facultativas y patógenas para muchas especies de vertebrados (Winfield y Groisman, 2003).

A lo largo de los últimos años la nomenclatura del género *Salmonella* ha ido sufriendo variaciones. Actualmente, mediante técnicas de hibridación ADN-ADN, el análisis electroforético múltiple de enzimas y el análisis comparativo de secuencias de ARN ribosomal se reconocen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). A su vez, *S. enterica* comprende seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Hasta el momento, se han caracterizado más de 2.500 serovares del género *Salmonella* clasificados por la Organización Mundial de la Salud en base a su fórmula antigénica (antígeno somático O y antígeno flagelar H) (Grimont y Weill, 2007).

El genoma de *Salmonella enterica* tiene un tamaño promedio de 4,8 Mb (McClelland *et al.*, 2001), determinados serovares como Choleraesuis, Typhimurium y Enteritidis presentan al menos un plásmido de entre 50-90 kb (Rotger y Casadesús, 1999). Tanto en el cromosoma como en el plásmido existen elementos que codifican factores de virulencia necesarios para la colonización y supervivencia bacterianas en el hospedador (Rotger y Casadesús, 1999; McGhie *et al.*, 2009). Algunos de estos factores de virulencia están codificados en las denominadas “islas de patogenicidad” (SPI, “*Salmonella* pathogenicity island”). La presencia de las SPI en los diferentes serovares de *S. enterica* probablemente se deba a eventos de transferencia horizontal interespecífica (Hensel, 2004; Gerlach y Hensel, 2007; Kelly *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012).

Más del 99% de los aislados clínicos responsables de las enfermedades causadas a los animales homeotermos, incluido el hombre, pertenecen a la subespecie I de *S. enterica*. El 1% restante corresponde a aislados clínicos pertenecientes al resto de subespecies de *S. enterica* y a la especie *S. bongori*, con origen en animales poiquilotermos y en el medio ambiente (Baumler, 1997). Otra característica mostrada por ciertos serovares de la subespecie *enterica* es la diversidad en su rango de hospedador y la severidad de la enfermedad que producen. Por ejemplo, el serovar Typhi presenta un estrecho rango de hospedador y causa infecciones sistémicas graves exclusivamente en humanos y primates superiores. Por el contrario, los serovares Enteritidis

y Typhimurium presentan un amplio rango de hospedador y provocan enfermedades gastrointestinales en varias especies animales incluido el hombre, teniendo también la capacidad de producir infecciones sistémicas (Baumler, 1997; Chan *et al.*, 2003).

En el hombre, las infecciones mas frecuentes por *S. enterica* dan lugar a enterocolitis (serovares Typhimurium y Enteritidis) y fiebre tifoidea (serovares Typhi y Paratyphi) (Bäumler *et al.*, 2011). Se adquieren al consumir alimentos mal cocinados o por la ingestión de fruta y verdura frescas tratadas con aguas fecales. Además, una fuente importante de contaminación son los reptiles (Winfield y Groisman, 2003). Por tanto, la ruta fecal-oral es el tipo de transmisión más común para estos serovares. En el caso del serovar Typhi algunos de los individuos infectados pasan a ser portadores asintomáticos de la bacteria durante periodos de tiempo que van desde un año a toda la vida (Thompson *et al.*, 2009). Estos portadores asintomáticos son reservorios de la enfermedad que pueden arrojar al medio 10^8 bacterias por g de heces (Gopinath *et al.*, 2012). La identificación y tratamiento de estos individuos es crucial para el control de la enfermedad. Los modelos animales que reproducen estas patologías han sido de gran valor para el análisis de las bases moleculares y celulares de la infección por *S. enterica*. Los modelos más usados son el del serovar Typhimurium en ratones, por ser éste el modelo alternativo más asequible al asemejar la fiebre tifoidea (Santos *et al.*, 2001), así como el modelo de “persistencia” o infección crónica, como el ratón 129sv (*Slc11a1*^{+/+}) (Monack *et al.*, 2004).

INTERACCIÓN DE *Salmonella* CON EL HOSPEDADOR EN MODELOS DE RATÓN.

El modelo animal de ratón es el más empleado en el estudio de la interacción patógeno-hospedador *in vivo* (Grassl y Finlay, 2008). La susceptibilidad de estos animales a la infección por patógenos viene determinada por varios factores. Uno de ellos lo constituyen las mutaciones en el gen *Slc11a1*, también conocido como *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*) (Vidal *et al.*, 1995). En el modelo de ratón BALB/c (*Slc11a1*^{-/-}), la infección por *S. Typhimurium* da lugar a una infección sistémica aguda, con una patología intestinal similar a la observada en pacientes humanos de fiebres tifoideas. Asimismo, el pre-tratamiento de ratones C57BL/6 (*Slc11a1*^{+/+}) con estreptomycin origina una infección que cursa con inflamación intestinal crónica, fibrosis intestinal y diarrea, signos similares a los de la gastroenteritis producida en humanos por *S. Typhimurium* (Stecher *et al.*, 2006; Grassl *et al.*, 2008). La infección crónica viene determinada por un balance entre la capacidad de la bacteria de sobrellevar la respuesta del hospedador y la capacidad del sistema

inmune del hospedador para eliminar la bacteria (Ruby *et al.*, 2012).

Estudios recientes han demostrado la importancia de la proteína Scl11a1 en el control de la infección, cuya temprana expresión durante la infección por *S. Typhimurium* conduce a una mayor respuesta inflamatoria intestinal así como un descenso de la carga bacteriana (Valdez *et al.*, 2009). El gen *Scl11a1* codifica una proteína integral de membrana localizada en el fagolisosoma y expresada exclusivamente por fagocitos profesionales (Gruenheid *et al.*, 1997; S. M. Vidal *et al.*, 1993). La resistencia aportada por esta proteína observada en ratones infectados con *S. Typhimurium* se ha atribuido a su capacidad para limitar la disponibilidad de hierro a la bacteria intracelular. Este efecto se debe a múltiples acciones, entre ellas a su función como transportador protón-dependiente de cationes divalentes (Blackwell *et al.*, 2003). Además, la proteína Scl11a1 también actúa indirectamente al reducir la captación de hierro e incrementar su exportación en macrófagos infectados con *S. Typhimurium* (Nairz *et al.*, 2009; Fritsche *et al.*, 2012). Por otro lado, la reducción en la concentración del hierro intracelular induce la producción de compuestos antimicrobianos como el factor de necrosis tumoral-alfa (TFN- α), la interleuquina-6 (IL-6) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Fritsche *et al.*, 2003; Nairz *et al.*, 2010). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de una buena homeostasis del hierro por parte del hospedador durante el proceso infeccioso.

Una característica observada en los tejidos infectados con *S. Typhimurium* es el reducido número de bacterias intracelulares que se observa (3-4 bacterias por célula) (Monack *et al.*, 2004; Thöne *et al.*, 2007). En los tejidos, las bacterias se localizan en focos de infección independientes que aumentan en número y tamaño a lo largo del proceso infeccioso (Boyle *et al.*, 2007; Mastroeni *et al.*, 2009). Además, se ha observado que, en la lámina propia de ratones infectados, *S. enterica* serovar Typhimurium infecta células CD18 negativas/CD45 negativas que podrían ser fibroblastos (Núñez-Hernández *et al.*, 2012).

INTERACCIÓN DE *Salmonella* CON DISTINTOS TIPOS CELULARES DEL HOSPEDADOR.

Otro nivel de estudio de la infección causada por *Salmonella* lo constituyen las líneas celulares eucariotas, cuyo empleo como modelo *in vitro* permite analizar los mecanismos patogénicos de *S. enterica* (Dandekar *et al.*, 2012). La infección de las células en cultivo permite determinar con relativa facilidad dos etapas clave en el

proceso infeccioso: la invasión celular y la supervivencia y/o proliferación intracelular. No obstante, hay que tener en cuenta que las características de estas etapas de la infección varían entre las diferentes cepas utilizadas como referencia, así como en función de la línea celular empleada (García-del Portillo, 2001; Alonso y García-Del Portillo, 2004; Garai *et al.*, 2012).

Comportamiento de *Salmonella* en el interior de células epiteliales.

Una característica de *Salmonella* que contribuye a su virulencia es su habilidad para invadir células no fagocíticas como las células epiteliales. El mecanismo que emplea para ello es conocido como “fagocitosis inducida por la bacteria” (Alonso y García-Del Portillo, 2004). En este mecanismo de entrada intervienen proteínas efectoras secretadas por la bacteria a través del sistema de secreción de tipo tres (SST3) de la “isla de patogenicidad” SPI-1 (McGhie *et al.*, 2009). El SST3 de *Salmonella* es similar al aparato flagelar y se compone por un complejo de macromoléculas de al menos 20 proteínas que forman el aparato de secreción, denominado genéricamente como “complejo aguja” (Haraga *et al.*, 2008). Este complejo aguja abarca las membranas interna y externa de la bacteria y contacta con la membrana de la célula hospedadora por el extremo del canal de secreción. Las proteínas efectoras secretadas a través del SST3 mimetizan las funciones de algunas proteínas de la célula hospedadora (Patel *et al.*, 2005). Por ejemplo, SopE2 activa directamente GTPasas eucarióticas de la familia Rho, mientras que SipA actúa sobre la actina promoviendo su polimerización (McGhie *et al.*, 2009). Gracias a éstas y otras proteínas efectoras, *Salmonella* es capaz de modular el citoesqueleto de actina alterando la estructura de la membrana eucariótica (Srikanth *et al.*, 2011). Estas alteraciones en la membrana eucariótica conllevan al englobamiento e internalización de la bacteria. En este proceso, la bacteria queda encerrada en un compartimento denominado SCV (“*Salmonella*-containing vacuole”) (García-del Portillo y Finlay, 1995). La maduración de la SCV es un proceso fundamental para la supervivencia intracelular de *Salmonella*. En este proceso juegan un papel importante los efectores secretados por el SST3 de SPI-2 (Figueira y Holden, 2012), que conducen a la adquisición o pérdida de determinados marcadores endocíticos, como EEA1, varias Rab GTPasas, el receptor de transferrina TfR1 y glicoproteínas lisosomales. Esta remodelación en la composición de la membrana de la SCV modula el grado de fusión del SCV con el lisosoma, aunque este tema está aún en controversia (Drecktrah *et al.*, 2007; Steele-Mortimer, 2008). Durante este proceso de maduración, la SCV se va aproximando al núcleo y al aparato de Golgi. Es entonces cuando

Salmonella comienza a dividirse y, mediante la acción de la proteína efectora SifA, se forman estructuras túbulo-vesiculares denominadas Sifs ("*Salmonella*-induced filaments"), cuya función es aún desconocida (García-del Portillo, Zwick, *et al.*, 1993; McGhie *et al.*, 2009). Algunos efectores involucrados en la invasión y supervivencia intracelular de *Salmonella* tienen una funcionalidad dual, lo que les permite intervenir en varios procesos independientes. Por ejemplo, el extremo C-terminal de SifA presenta una actividad GTPasa, mientras que el extremo N-terminal presenta una actividad motora por unión a kinesina (Agbor y McCormick, 2011).

Se ha demostrado que en el interior de células epiteliales *Salmonella* prolifera, obteniéndose un índice de proliferación [relación de bacterias viables a 24h post-infección (p. i.) frente a 2h p. i.] en un rango de 7-10 veces (Martínez-Moya *et al.*, 1998). No obstante, un reciente estudio realizado en el modelo de células epiteliales humanas HeLa afirma que aproximadamente un 20% de las células infectadas contienen una población citosólica de bacterias con una replicación independiente de SPI-2 (Malik-Kale *et al.*, 2012). Esta población de bacterias citosólicas contribuye significativamente a la alta tasa de proliferación observada en células epiteliales.

Comportamiento de *Salmonella* en el interior de células fagocíticas.

Las células fagocíticas han sido empleadas como modelo de infección *in vitro* por su importancia en la respuesta inmune innata del hospedador sobre todo en infecciones sistémicas. *Salmonella* es capaz de sobrevivir en el interior de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Alonso y García-Del Portillo, 2004). El modelo de infección más extendido dentro de estos tipos celulares es el de macrófagos. En este tipo celular *Salmonella* también queda alojada en una SCV y, mediante el empleo de efectores secretados por SST3 de SPI-2, modula la biogénesis de la vacuola (Uchiya *et al.*, 1999). No obstante, a diferencia de las células epiteliales, la entrada de *Salmonella* en macrófagos ocurre mediante dos mecanismos: a través de SPI-1, como se ha descrito para células epiteliales; o por fagocitosis, previa opsonización de la bacteria. El hecho de que ocurra uno u otro mecanismo de internalización determina el ambiente intracelular, la supervivencia intracelular y replicación de *Salmonella*, y por tanto su virulencia (Drecktrah *et al.*, 2006). Mediante una combinación de modelos matemáticos y análisis experimentales se ha demostrado que sólo el 5% de las veces que *Salmonella* contacta con el macrófago ocurre un evento de infección (Gog *et al.*, 2012). Además, se ha observado que tras un primer evento de infección la probabilidad de una segunda infección disminuye. Esta segunda infección contribuye a au-

mentar significativamente el número de bacterias intracelulares. Varios estudios han demostrado que los macrófagos controlan el crecimiento de *Salmonella* empleando diversos mecanismos: producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y del nitrógeno (RNI) (Vazquez-Torres *et al.*, 2000); privación nutricional, como la ejercida sobre el hierro por la proteína Scl11a1 (Nairz *et al.*, 2009; Fritsche *et al.*, 2012); así como síntesis de péptidos antimicrobianos (Ganz, 2003). *Salmonella* utiliza diversas estrategias para adaptarse al estrés del ambiente intravacuolar, como la modificación de la envuelta o el tamponamiento de compuestos reactivos producidos por las células infectadas. Tal es el caso de los sistemas sensores de dos componentes como PhoP/Q y PmrA/B capaces de detectar señales medioambientales como la acidificación del medio o bajas concentraciones de Mg^{2+} ; o como SoxRS, que responde tanto a ROI como a RNI (Flannagan *et al.*, 2009; Shen y Fang, 2012).

La infección por *Salmonella* culmina, en muchos casos, con la muerte del macrófago, lo que permite la diseminación de la bacteria a otras células (Mastroeni *et al.*, 2009). En macrófagos se da un tipo especial de muerte celular, denominada piroptosis. La piroptosis se inicia frente a estímulos provocados por la presencia de *Salmonella* en el ambiente intracelular, más concretamente por la presencia de proteína flagelar (Fink y Cookson, 2007; Miao *et al.*, 2011). La piroptosis se caracteriza por estar inducida por la activación de la caspasa-1 y por desencadenar una respuesta inflamatoria (Bergsbaken *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2011). Se ha propuesto que esta muerte celular es importante para un buen control de la infección al conducir a señales de alarma.

Comportamiento de *Salmonella* en el interior de fibroblastos.

El empleo del modelo de infección basado en fibroblastos está menos extendido entre la comunidad científica. Sin embargo, se ha defendido la idoneidad de este modelo en estudios de *S. Typhimurium* en base a varias razones: i) permite ensayar las funciones de supervivencia y proliferación bacteriana intracelular separadamente, lo que constituye una tarea más compleja en el modelo de macrófagos (García-del Portillo, 2001); ii) el fibroblasto es un tipo celular que en los animales constituye una población omnipresente y heterogénea capaz de interactuar con células inmuno-competentes (Sorrell y Caplan, 2009); iii) y es considerado un posible reservorio de la bacteria durante las infecciones crónicas causadas por *S. Typhimurium* (Boyle *et al.*, 2007). Estas características se relacionan con el hecho de que durante la infección de fibroblastos, *S. Typhimurium* permanece en un estado de persistencia observándose

en la mayoría de las líneas de fibroblastos utilizadas un promedio de entre dos y tres bacterias por célula (Martínez-Moya *et al.*, 1998). En concreto, para los fibroblastos de riñón de rata NRK-49F (“normal rat kidney”), se observan valores de índice de proliferación de $\sim 0,6$, reflejando el cociente de bacterias viables intracelulares a 24h en relación a 2h (Martínez-Moya *et al.*, 1998). Otro dato que apoya la idea de que el fibroblasto pueda actuar como reservorio es su capacidad para mantener su integridad y viabilidad durante largos períodos de tiempo, aun conteniendo bacteria en su interior (Cano *et al.*, 2003). Estas observaciones concuerdan con lo descrito en tejidos animales, en los que destaca una tasa de crecimiento intracelular baja (Helaine *et al.*, 2010).

El modelo de infección de fibroblastos ha permitido conocer que funciones necesarias para la supervivencia y proliferación de *S. Typhimurium* en macrófagos pueden a su vez limitar el crecimiento del patógeno en fibroblastos. Es el caso del sistema de dos componentes PhoP-PhoQ, los reguladores SpvR y SlyA, el factor sigma alternativo RpoS y la proteína IgaA (Cano *et al.*, 2001). La inactivación de estas funciones causa un marcado incremento en la proliferación intracelular bacteriana durante la infección del fibroblasto.

Las diferencias en el patrón de crecimiento intracelular de *S. Typhimurium* que se han observado en los distintos tipos celulares aquí expuestos dependen tanto de una respuesta por parte del patógeno como por parte de la célula hospedadora (Grant *et al.*, 2009; Mastroeni *et al.*, 2009). En este trabajo nos centraremos principalmente en el papel que desempeña la bacteria en esta interacción.

ESTUDIOS DE CARÁCTER GLOBAL DEL PROCESO DE INFECCIÓN CAUSADO POR *Salmonella*.

Una fase determinante para el establecimiento de la infección por *S. Typhimurium* es su paso por el intestino del hospedador. Diversos estudios de proteómica han pretendido identificar los cambios de expresión en *S. Typhimurium* bajo condiciones de anaerobiosis y alta osmolaridad similares a las del intestino. Estos estudios han revelado que en estas condiciones las proteínas relacionadas con el metabolismo de la arginina y otras que responden a anaerobiosis, como Fnr y ArcA/B, se ven inducidas, lo cual también ha sido observado en estudios *in vivo* (Encheva *et al.*, 2009; Sonck *et al.*, 2009).

Este tipo de estudios en condiciones definidas de crecimiento ha sido conti-

nuado con otros trabajos que han estudiado la expresión global de genes o proteínas de *S. Typhimurium* durante la infección. En un estudio *in vivo*, en el modelo de infección sistémica de ratón, Becker y colaboradores descubrieron que sólo una minoría de enzimas son esenciales para la virulencia de *S. Typhimurium* en este modelo. Estas enzimas son principalmente aquellas relacionadas con la biosíntesis de compuestos que la bacteria no puede obtener del hospedador o con el metabolismo central y la producción de energía, como AroA, MsbB o GlnA (Becker *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en una cepa de ratón 129X1/Sv (Scl11a1^{+/+}), sugieren que los factores de virulencia codificados en la SPI-1 de *S. Typhimurium* son importantes para mantener un estado de persistencia (Lawley *et al.*, 2006). Asimismo, se ha observado que durante este estado de persistencia, *S. Typhimurium* induce genes que codifican proteínas cuyas funciones aún no han sido descritas, como *STM0374* o *STM4310* (Lawley *et al.*, 2006).

No obstante, el estudio de los modelos *in vivo* ofrece una gran complejidad. La heterogeneidad de células hospedadoras y la presencia de factores adicionales, como la respuesta inmune o las diferentes concentraciones de nutrientes, pueden afectar a la supervivencia y replicación del patógeno (Dandekar *et al.*, 2012). El empleo de las líneas celulares epiteliales y de macrófagos para analizar los perfiles de expresión global de *S. enterica* ha permitido indagar sobre los mecanismos bacterianos de adaptación a la vida intracelular. Así, se ha observado que un 25% del genoma de *S. Typhimurium* muestra cambios de expresión durante la infección de macrófagos de ratón (Eriksson *et al.*, 2003). Más recientemente, un estudio similar del serovar Typhimurium ha comparado los cambios transcriptómicos que sufre la bacteria en el interior de células epiteliales y en macrófagos (Hautefort *et al.*, 2008). Así se han encontrado muchas similitudes en la infección los dos tipos celulares por *S. Typhimurium*. Sin embargo, algunos genes bacterianos inducidos durante la infección células epiteliales estaban reprimidos en macrófagos. Tal es el caso de la proteína efectora SipC y del transportador de cationes divalentes SitD (Hautefort *et al.*, 2008). Estas diferencias sugieren que *S. Typhimurium* altera su perfil de expresión en función del tipo celular en el que reside. La habilidad de *S. Typhimurium* de causar enfermedad no sólo depende de factores propios, si no también de su capacidad para emplear factores eucarióticos que faciliten su proliferación. De hecho, un reciente estudio realizado sobre células epiteliales humanas infectadas con *S. Typhimurium* ha identificado más de 200 genes eucarióticos que influyen en la tasa de proliferación de la bacteria. Algunos de estos genes eucarióticos, como FTHL17, HACL1 y AMDHD2,

están involucrados en el transporte de hierro y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, respectivamente (Thornbrough *et al.*, 2012).

Estos estudios globales han empleado líneas celulares epiteliales y de macrófagos como modelo de infección *in vitro* en las que *S. Typhimurium* prolifera activamente. No obstante, consideramos más apropiado el modelo de infección de fibroblastos por la baja tasa de proliferación de la bacteria en este modelo. Nuestro grupo ha realizado recientemente un análisis de transcriptómica en fibroblastos de riñón de rata infectados con el serovar Typhimurium tras 24 horas de infección (Núñez-Hernández *et al.*, 2012). En los datos obtenidos se observó un cambio de expresión del 2% del genoma bacteriano (138 genes) durante el estado no proliferativo de la estirpe silvestre en fibroblastos. El 48% de estos genes no tienen una función descrita.

ADAPTACIÓN DE *Salmonella* AL ESTILO DE VIDA INTRACELULAR. LA ESCASEZ DE HIERRO.

La supervivencia de *S. Typhimurium* en el ambiente intracelular depende de su capacidad de adaptación a éste, lo cual determinará el éxito de la infección. La bacteria se adapta regulando la expresión de determinados genes para modificar su metabolismo en función del ambiente en el que se encuentra. En particular, estas modificaciones van dirigidas a hacer frente a las limitaciones nutricionales existentes en el ambiente intracelular (Dandekar *et al.*, 2012). Los estudios globales de la expresión de genes de *S. enterica* realizados en macrófagos y células epiteliales, así como el realizado por nuestro grupo en fibroblastos, han aportado indicios sobre los posibles aspectos nutricionales de *Salmonella* en el ambiente intravacuolar.

Los cambios observados en la expresión del genoma del serovar Typhimurium en macrófagos sugieren que la bacteria se encuentra en un ambiente limitante en fosfato y magnesio, donde el gluconato y otros carbohidratos relacionados podrían ser la principal fuente de carbono (Eriksson *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios transcriptómicos del serovar Typhi durante la infección de macrófagos humanos también han revelado una inducción de genes asociados con el transporte de magnesio, aunque no se encontraron evidencias que apoyaran la escasez de hierro en la SCV (Faucher *et al.*, 2006). En el interior de células epiteliales el serovar Typhimurium presenta, sin embargo, una inducción de genes relacionados con el transporte de magnesio, hierro y fosfato. Así se observó la inducción de algunos genes relacionados con el transporte de hierro, como *sitD* y *fepA*, cuyos niveles de expresión eran bajos en macrófagos (Hautefort *et al.*, 2008). El análisis transcriptómico realizado por nuestro grupo en

fibroblastos sugiere que el ambiente intravacuolar es limitante en magnesio, fosfato, hierro y manganeso para el serovar Typhimurium, apoyando los resultados obtenidos con células epiteliales y con macrófagos anteriormente citados. Como novedad, los datos indicaron además que no existe una inducción de los genes relacionados con el transporte de gluconato, contrariamente a lo que ya ha sido descrito en macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003). Se sugiere, por tanto, que *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos podría emplear fuentes de carbono alternativas, como los ácidos grasos u otros azúcares (Núñez-Hernández, 2008). La membrana de la SCV se compone de glicoproteínas lisosomales (Lgp) (García-del Portillo *et al.*, 1993). Al igual que muchas otras glicoproteínas, las lgp contienen como primera derivación azúcares de N-acetilglucosamina-N-acetilglucosamina (NAcGlc-NAcGlc). De ser liberados por potenciales glicosidasas, estos oligosacáridos podrían ser empleados por la bacteria como fuente de carbono durante la infección de fibroblastos. Se ha descrito que porinas de membrana como ChiP y ChiQ están relacionadas con la captación de quitobiosa (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009). La quitobiosa es un disacárido de NAcGlc-NAcGlc derivado de la degradación de quitina, similar al que aparece como derivación de las glicoproteínas eucarióticas. Esto nos hizo pensar que *S. Typhimurium* pudiera estar empleado ChiP y ChiQ para la captación de estos oligosacáridos en el ambiente intravacuolar.

Los trabajos de transcriptómica realizados con el serovar Typhimurium indican que el ambiente intravacuolar de macrófagos, células epiteliales y fibroblastos es limitante en hierro (Eriksson *et al.*, 2003; Hautefort *et al.*, 2008; Núñez-Hernández, 2008). Estudios anteriores a estos ya apoyaban la escasez de hierro de la SCV al identificar una inducción en el gen *iroA* durante la infección de células epiteliales (García-del Portillo *et al.*, 1992).

Principales vías de adquisición de hierro en *Salmonella*.

Las características fisicoquímicas del hierro lo hacen muy apropiado como cofactor de proteínas que intervienen en importantes procesos biológicos, como la regulación y biosíntesis del ADN, transporte de oxígeno y respiración entre otros (Beinert *et al.*, 1997). En condiciones fisiológicas, el hierro puede encontrarse en dos estados de óxido-reducción: la forma reducida en anaerobiosis, como ion ferroso (Fe^{2+}) muy soluble y, la forma oxidada en aerobiosis, como ion férrico (Fe^{3+}) muy insoluble. Bajo condiciones aeróbicas, el hierro puede ser extremadamente dañino al reaccionar con especies reactivas del oxígeno dando lugar, mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss, a radicales hidroxilo mucho más reactivos y tóxicos (Andrews *et al.*,

2003). Por eso, el hierro es muy poco accesible para los organismos en la mayoría de los nichos ecológicos a pesar de ser el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre.

Debido a ello, los organismos han desarrollado diferentes estrategias para la obtención de este importante micronutriente. Entre las estrategias desarrolladas por las bacterias para adquirir la concentración de hierro necesaria para un crecimiento óptimo (10^{-7} - 10^{-5} M) se encuentran: i) la reducción del hierro o reducción del pH extracelular; ii) el empleo de quelantes de hierro de alta eficiencia asociado a transportadores específicos de alta afinidad; iii) y una buena gestión del almacenamiento intracelular del ión (Andrews *et al.*, 2003).

En el género *Salmonella* se han caracterizado hasta el momento tres vías principales de adquisición de hierro (**Fig. 1**). La expresión de los genes que codifican las diferentes proteínas que componen estas vías esta sujeta a una regulación coordinada que depende de condiciones ambientales como la concentración de hierro disponible, la oxigenación y la fase de crecimiento (Drago-Serrano, 2009). La adquisición de hierro a través estas vías se basa en dos mecanismos diferentes: la captación de ion férrico acompañado con sideróforos y la captación de ion ferroso sin la intervención de sideróforos (Drago-Serrano, 2009). A continuación se describen en detalle las tres vías de adquisición de hierro.

Vía de los catecolatos. Está controlada por los sistemas Iro, Fep y Cir (**Fig. 1**). Para la adquisición de hierro por esta vía *Salmonella* debe sintetizar y exportar al exterior sideróforos pertenecientes al grupo de los catecolatos: enterobactina y salmoquelina. La enterobactina (Ent), o 2,3-dihidroxibenzoil serina (DHBS), es una molécula tricíclica conocida hasta el momento como el quelante de hierro mas fuerte que existe (Gehring y Bradley, 1997; Ratledge y Dover, 2000).

Dada la alta eficiencia de la enterobactina como quelante de hierro, el hospedador ha desarrollado una estrategia para evitar la acción de este potente sideróforo. Esta estrategia consiste en la síntesis de una proteína denominada lipocalina-2 (Lcn-2), cuya expresión en los tejidos se induce durante la inflamación, constituyendo así un importante mecanismo de defensa contra patógenos (Raffatellu *et al.*, 2009). Se ha comprobado que el efecto bacteriostático de la Lcn-2 depende de su capacidad de secuestrar la enterobactina, bloqueando de este modo su actividad como quelante de hierro (Flo *et al.*, 2004).

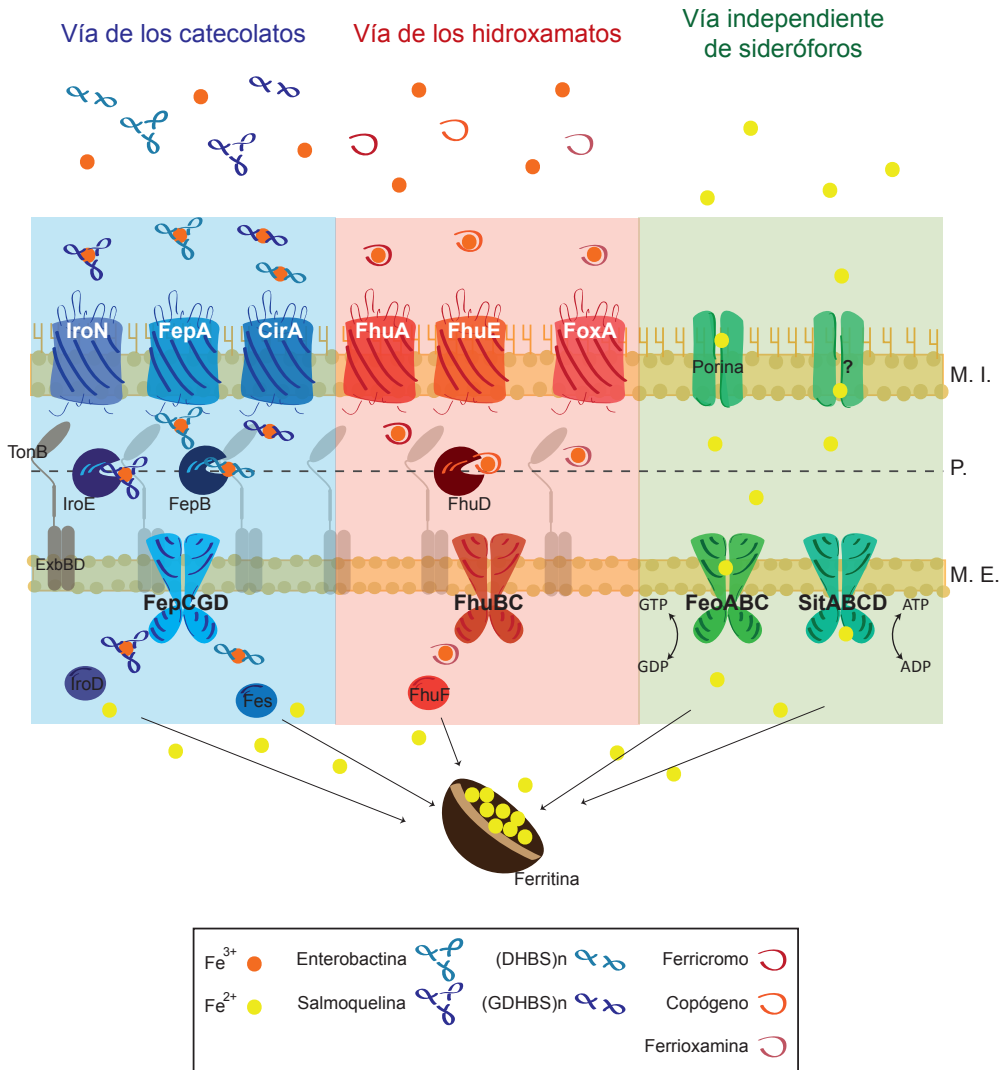


Figura 1. Principales vías de adquisición de hierro de *S. Typhimurium*. Vía de los catecolatos o sideróforos endógenos; vía de los hidroxamatos o sideróforos exógenos; y vía independiente de sideróforo o de ion ferroso, en las que participan los sistemas Iro/Fep/Cir, Fhu/Fox y Feo/Sit, respectivamente. El transporte de ferri-catecolatos y ferri-hidroxamatos al periplasma es llevado a cabo gracias a la energía aportada por el complejo TonB-ExbBD. En el periplasma las proteínas IroE, FepB y FhuD guían a los ferri-sideróforos a la membrana interna. Ahí, transportadores de tipo ABC dependientes de ATP los introducen en el citoplasma donde el Fe^{3+} es liberado y reducido a Fe^{2+} para ser almacenado. Los iones presentes bajo condiciones de anaerobiosis (Fe^{2+}) llegan al periplasma a través de porinas y son conducidos al citosol por FeoABC o SitABCD empleando la energía del GTP o ATP, respectivamente.

Asimismo, para poder contrarrestar el efecto de la Lcn-2, algunas enterobacterias patógenas han adquirido el locus *iroA* (compuesto por los genes *iroBCDE* e *iroN*), el cual contribuye a su virulencia durante la infección (Smith, 2007). Gracias a estas funciones la bacteria puede de glicosilar la enterobactina en diferentes posiciones originándose una nueva molécula: la salmoquelina (GDHBS) (Bister *et al.*, 2004; Crouch *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009), que es capaz de evadir la acción de la Lcn-2 (Fischbach *et al.*, 2006). La salmoquelina ha sido denominada como el sideróforo “sigiloso” al no ser detectado por el hospedador gracias a la glicosilación (Skaar, 2010). Esta modificación aporta otras ventajas a las bacterias portadoras del locus *iroA*, ya que la glicosilación de la enterobactina aumenta la solubilidad y la estabilidad del sideróforo (Smith, 2007).

Los precursores monoméricos y diméricos de la enterobactina [(DHBS)_n] y de la salmoquelina [(GDHBS)_n] también pueden actuar como sideróforos, aunque con menor afinidad por el hierro. La captación de los diferentes complejos ferri-sideróforo generados se realiza gracias a tres transportadores específicos localizados en la membrana externa bacteriana que presentan una alta identidad entre ellos y que se incluyen dentro del grupo de receptores dependientes de TonB (Müller *et al.*, 2009). Los complejos Fe-Ent son reconocidos y transportados por la proteína FepA e IroN, los complejos Fe-Salmoquelina lo hacen a través de IroN y los precursores Fe-(DHBS)_n y Fe-(GHBS)_n mediante CirA (**Fig. 1**) (Hantke *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009). El mejor caracterizado de ellos es el transportador de membrana externa FepA, cuya estructura la configuran un barril-β y un dominio “tapón” localizado en el centro de la molécula (Chakraborty *et al.*, 2003). En el dominio tapón se encuentra una zona de unión al ligando y próximo al extremo amino terminal se sitúa la caja TonB. Esta caja es una región de residuos conservada en la secuencia de FepA que interactúa con el extremo C-terminal de TonB perteneciente al complejo TonB-ExbB-ExbD localizado en la membrana interna (Peacock *et al.*, 2006). Este complejo es el encargado de aportar la energía a los transportadores localizados en la membrana externa FepA, IroN y CirA (Chakraborty *et al.*, 2007). TonB no sólo está implicado en el transporte del hierro, sino que también lo está con el transporte de otros metales e incluso carbohidratos (Schauer *et al.*, 2008).

Tras atravesar la membrana externa, los complejos ferri-sideróforos pertenecientes a la vía de los catecolatos llegan al periplasma, donde se encuentran con dos proteínas periplásmicas: IroE y FepB. Aunque se ha descrito que la proteína IroE es

una esterasa, sigue siendo una incógnita el papel biológico que desempeña esta enzima (Bister *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2006). Se sabe con certeza que FepB es necesaria para el transporte del ferri-sideróforo desde la membrana externa a la interna (Hantke *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009; Crouch *et al.*, 2008). Sin embargo, también existe cierta controversia en cuanto a su localización y función concreta, ya que algunos autores consideran que forma parte del transportador de membrana interna de tipo ABC FepCGD (Hantke *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009), mientras que otros la consideran una chaperona periplásmica (Crouch *et al.*, 2008). A pesar de la especificidad en el transporte a través de la membrana externa, tanto Fe-Ent como Fe-Salmoquelina atraviesan la membrana interna a través de un único transportador: el transportador de tipo ABC FepCGD, dependiente de ATP (Crouch *et al.*, 2008).

Una vez atravesada la membrana interna y ya en el citosol los ferri-complejos se ven sometidos a la acción de las esterasas Fes e IroD. La función de ambas esterasas es muy similar y se da en dos pasos: el primero consiste en la unión a la Fe-Ent o Fe-Salmoquelina, respectivamente, de modo que permita la reducción y liberación del hierro; posteriormente se da la ruptura de la enterobactina o salmoquelina con el fin de disminuir la afinidad por la esterasa (Zhu *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2009). Según los requerimientos nutricionales de la bacteria, el Fe²⁺ liberado al citosol por este proceso puede ser incorporado directamente a las proteínas como cofactor, o bien almacenado en la ferritina, evitando de esta manera los efectos tóxicos que pueda provocar (Velayudhan *et al.*, 2007).

Vía de los hidroxamatos. Está controlada por los sistemas Fhu y Fox (**Fig. 1**). Es conocida como vía de la “piratería” del hierro o vía de los sideróforos exógenos. Empleando estos sistemas *S. Typhimurium* es capaz de captar sideróforos producidos y liberados al ambiente por otros microorganismos (hongos o bacterias) (Ratledge y Dover, 2000). Estos sideróforos pertenecen al grupo de los hidroxamatos como son los ferricromos, el coprógeno y diferentes tipos de ferrioxaminas (B, E y G). Al igual que para la vía de los catecolatos, tres transportadores de membrana externa son los encargados de captar específicamente cada tipo de hidroxamato. El transportador FhuA es el encargado de la captación del ferricromo acompañado con el hierro, mientras que FhuE capta coprógeno y ambos transportes necesitan la energía aportada por el complejo TonB-ExbB-ExbD (Ratledge y Dover, 2000; Drago-Serrano, 2009). Por otro lado, FoxA es capaz de transportar las ferrioxaminas B y E independientemente de TonB, mientras que el transporte de ferrioxamina G por FoxA es dependiente de

TonB (Kingsley *et al.*, 1999). El receptor FhuA de *E. coli* es homólogo al de *S. enterica* (Killmann *et al.*, 1998) y su estructura tridimensional ha sido ampliamente estudiada, presentando grandes similitudes con la proteína FepA (Chakraborty *et al.*, 2007; Noijnaj *et al.*, 2010). En el periplasma, la proteína FhuD facilita la interacción de los ferri-hidroxiatos con la permeasa de tipo ABC FhuBC localizada en la membrana interna y dependiente de ATP (Clarke *et al.*, 2002). En *E. coli* se ha descrito que la encargada de liberar el hierro acomplejado de los ferri-hidroxiatos una vez llegan al citosol es la reductasa citosólica FhuF (Matzanke *et al.*, 2004). Aunque esta función aún no ha sido descrita en *S. enterica*, es posible que el gen *fhuF* presente en su genoma tenga una función homóloga a la de la proteína FhuF de *E. coli*, al igual que ocurre con las proteínas anteriormente mencionadas (Drago-Serrano, 2009).

Vía independiente de sideróforos. Está controlada por los sistemas Feo y Sit (Fig. 1). En condiciones de anaerobiosis la forma reducida del hierro (Fe^{2+}) es la predominante. *S. Typhimurium* es capaz de captar este ion ferroso mediante una vía de captación de hierro independiente de sideróforo. Esta vía la constituyen principalmente dos transportadores de cationes divalentes, FeoABC y SitABCD, localizados en la membrana interna y pertenecientes a la familia de transportadores de tipo ABC. Todavía no está bien descrito el mecanismo a través del cual el Fe^{2+} llega al periplasma, pero se cree que lo hace por difusión a través de porinas de membrana externa (Drago-Serrano, 2009; Cartron *et al.*, 2006).

El transporte de ion ferroso a través de FeoABC está asociado a condiciones de baja concentración de oxígeno y, aunque el mecanismo no está del todo claro, hay indicios de que éste es dependiente de GTP (Cartron *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha comprobado que el transportador SitABCD tiene una alta afinidad tanto por Fe^{2+} como por Mn^{2+} (Boyer *et al.*, 2002). La mayor inducción de este transportador se da en presencia de altas concentraciones de oxígeno en fase estacionaria (Ikeda *et al.*, 2005). El transportador SitABCD obtiene la energía para el transporte a partir de la hidrólisis del ATP (Zhou *et al.*, 1999). En *S. enterica*, MntH es un transportador de membrana interna que actúa principalmente en el transporte de Mn^{2+} , aunque también se ha visto que interviene de forma secundaria en el transporte de Fe^{2+} (Boyer *et al.*, 2002).

Regulación de los sistemas de adquisición de hierro.

La bacteria regula el metabolismo del hierro en función de la disponibilidad de éste en el medio. Esta regulación es ejercida principalmente por la proteína Fur

(ferric uptake regulator). El modelo clásico de regulación por Fur fue descrito por primera vez en *E. coli*. Esta regulación consiste en una represión transcripcional de los genes diana mediada por la unión de la proteína Fur acomplejada con Fe^{2+} a regiones conservadas del promotor de dichos genes (Bagg y Neilands, 1987). En *S. enterica* se identificaron 14 genes reprimidos por Fe-Fur, entre ellos *fhuA*, *fhuB*, *foxA*, *fepA* y *fepD* (Tsolis *et al.*, 1995). Posteriormente a estos genes se sumaron *iroN* y *cirA* que junto con *fepA* codifican proteínas denominadas “proteínas de membrana externa reguladas por hierro” (IROMP) (Rabsch *et al.*, 2003). El sistema FeoABC también se ha comprobado que es reprimido por Fe-Fur (Cartron *et al.*, 2006). No obstante, la regulación del complejo SitABCD es más compleja debido a la dualidad como transportador de Fe^{2+} y Mn^{2+} , y su expresión se ve sometida a la acción de dos proteínas reguladoras: Fur y MntR. Por tanto, a la represión dependiente de hierro por la proteína Fur, se suma también la represión por MntR que usa como cofactores Mn^{2+} o Fe^{2+} , aunque este último con menor eficiencia (Ikeda *et al.*, 2005).

Sin embargo, la acción reguladora de la proteína Fur no se limita a estos transportadores. Recientemente se ha comprobado que bajo condiciones limitantes en oxígeno, la acción directa o indirecta de Fur afecta a la expresión de casi 300 genes de *S. enterica* (Troxell *et al.*, 2011). De manera indirecta, Fur controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo del hierro a través de la regulación que ejerce sobre el RNA regulador de pequeño tamaño RyhB (Massé *et al.*, 2007; Benjamin *et al.*, 2010). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que RyhB también contribuye a incrementar los niveles de hierro intracelular al favorecer la transcripción de *fepA* así como la producción de enterobactina (Salvail *et al.*, 2010). Además de la represión ejercida por Fe-Fur, se ha demostrado su función como activador e incluso como represor en ausencia de hierro como cofactor. Es el caso del gen *iro-28* de *S. Typhimurium*, que es activado por la proteína apo-Fur (Hall y Foster, 1996; Foster y Hall, 1992).

Trabajos recientes han demostrado la contribución de Fur en la virulencia de *Samonella* mediante la activación directa o indirecta de importantes reguladores de SPI-1 como HilD o HilA. Un ejemplo de ello es la represión de la expresión del gen *hns* ejercida por Fur, lo que conlleva a una activación de HilA (Troxell *et al.*, 2011). Asimismo, se ha comprobado que Fe-Fur activa HilD mediante la interacción directa con una región aguas arriba de su promotor, lo cual pone de manifiesto la relación entre la capacidad invasiva de *S. Typhimurium* y las concentraciones de hierro y oxígeno del

hospedador (Teixidó *et al.*, 2011). No obstante, la supervivencia de *S. Typhimurium* en el interior de macrófagos y células epiteliales, así como durante la infección de ratones no parece verse afectada por la carencia de Fur (García-del Portillo *et al.*, 1993).

Importancia del hierro en la interacción patógeno-hospedador.

La importancia de una adecuada adquisición de hierro se hace más evidente durante la infección, dado que uno de los mecanismos de defensa empleados por el hospedador frente a infecciones por patógenos es la “inmunidad nutricional” (Weinberg, 2000). Este mecanismo consiste en limitar la disponibilidad del hierro al patógeno (Skaar, 2010). En los organismos eucariotas, el hierro circula por el plasma unido a la transferrina. A través de receptores específicos de la transferrina (TfR1), las células eucariotas son capaces de obtener el hierro circulante en la sangre. No obstante, existen otros mecanismos de abastecimiento de hierro como el transportador de metales divalentes (DMT1) o la eritrofagocitosis, predominando uno u otro en función del tipo de célula eucariota. Estos mecanismos de abastecimiento de hierro contribuyen a incrementar las reservas de hierro lábil (LIP) en la célula eucariota, que es utilizado para el almacenamiento o incorporación a proteínas (Hentze *et al.*, 2010; Johnson y Wessling-Resnick, 2011). Ante la infección por un patógeno, como *S. enterica*, los estímulos pro-inflamatorios conducen a la disminución del LIP. Estos estímulos provocan una represión de las rutas de abastecimiento mediante TfR-1, así como un incremento de las rutas de exportación y almacenamiento del hierro mediante la ferroportina y ferritina, respectivamente (Nairz *et al.*, 2010). Además de ser un nutriente esencial para la bacteria, el hierro también afecta a la eficacia de las funciones inmunológicas en macrófagos, según se ha visto en estudios *in vitro* (Nairz *et al.*, 2007). Debido a ello, la existencia de un correcto equilibrio en la concentración de hierro de la célula hospedadora es fundamental. Mientras que ciertas cantidades de hierro son necesarias para la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), un exceso de hierro afecta negativamente a la función antimicrobiana al disminuir la producción de óxido nítrico (NO) y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Weinberg, 2000; Nairz *et al.*, 2007, 2010).

Varios estudios han demostrado que la virulencia de *S. enterica* depende de su habilidad para obtener hierro del hospedador. Así, mutantes defectivos en los transportadores de hierro mencionados mas arriba son avirulentos o muestran dificultades durante la infección en experimentos *in vivo*. Tal es el caso de los transportadores IroN, FepA y CirA, cuya carencia simultanea se ha visto relacionada con una marcada

atenuación en el modelo de ratón (Rabsch *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2006). No obstante, en el modelo de infección de cerdos no se ha observado una atenuación del mutante triple *iroN fepA cirA* ni del mutante *fepC* (Bearson *et al.*, 2008). La virulencia de mutantes carentes de los transportadores de la vía de adquisición de hierro independiente de sideróforo también parece estar afectada. En el modelo de ratón, el mutante *sitABCD* y el mutante *feoB* se muestran significativamente atenuados (Jana-kiraman y Slauch, 2000; Boyer *et al.*, 2002). En este modelo de infección también se ha comprobado que el doble mutante *sitABCD/feoB* es avirulento (Boyer *et al.*, 2002).

A nuestro conocimiento, hasta la fecha no hay antecedentes de trabajos que estudien el conjunto de estos sistemas combinando la inactivación de genes así como el análisis de las cantidades relativas de estos transportadores en la bacteria intracelular.

OBJETIVOS

El análisis de transcriptómica realizado con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium durante la infección de fibroblastos NRK-49F ha permitido identificar 138 genes que muestran una expresión diferencial exclusivamente en bacteria intracelular que no prolifera. Muchos de estos genes, aproximadamente un 48%, son de función desconocida. De este análisis también se deduce que la bacteria podría estar empleando fuentes de carbono alternativas al gluconato y que el ambiente intravascular es limitante en magnesio, manganeso, fosfato y hierro.

En base a estos antecedentes y con el objeto de dilucidar aspectos ambientales y nutricionales ligados al mantenimiento de un estado de no proliferación intracelular por *S. Typhimurium*, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Identificar genes de *S. Typhimurium* que juegan un papel relevante en la adaptación al estado no proliferativo durante la infección de fibroblastos.
2. Examinar la expresión de transportadores de oligosacáridos de N-acetilglucosamina en bacteria intracelular durante la infección de fibroblastos.
3. Caracterizar el mecanismo de captación del hierro por *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos y su implicación en la persistencia intracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Estirpes bacterianas y plásmidos

Las estirpes de *S. Typhimurium* y *E. coli*, así como los plásmidos usados en este estudio se describen en las Tablas A1, A2, A3, A4 y A5 del Anexo.

Bacteriófagos

Como bacteriófago transductor se usó P22 HT105/11 (Schmieger, 1972).

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados tanto en los ensayos de detección de proteínas como en la tinción por inmunofluorescencia fueron los siguientes:

- Policlonal de conejo anti-lipopolisacárido del serovar Typhimurium grupo B, factores 1, 4, 5, 12 (Difco Laboratories), dilución 1:2000.
- Monoclonal de ratón anti-FLAG (clon M2, Sigma), dilución 1:5000.
- Monoclonal de ratón anti-HA (clon 16B12, Covance), dilución 1:10000.
- Policlonal de conejo anti-GroEL (Sigma), dilución 1:10000.
- Monoclonal de ratón anti-DnaK (clon 8E2/2, Enzo) 1:10000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Policlonal de cabra anti-conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes), dilución 1:1000.
- Policlonal de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (BIO-RAD), dilución 1:5000.
- Policlonal de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (BIO-RAD), dilución 1:5000.

Líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes:

- NRK-49F: fibroblastos de riñón de rata (ATCC CRL 1570).
- HeLa: células epiteliales de carcinoma cervical humano (ATCC CCL2).
- BJ-5ta: fibroblastos de prepucio humano (ATCC CRL-4001).

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Cultivo de bacterias

Para el crecimiento de bacterias se usó el medio rico en nutrientes Luria y Ber-

tani (LB) (Maloy, 1990). Su composición es de 10 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar a una concentración de 15 g/L. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con kanamicina (30 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL), ampicilina (50 µg/mL) o tetraciclina (10 µg/mL).

Para los experimentos realizados en el estudio del metabolismo del hierro el medio LB fue suplementado con FeCl_3 (60 µM) o con ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) como quelante (50 µM) cuando fue necesario (García-del Portillo *et al.*, 1993).

El medio SOC (“Super Optimal broth with Catabolite repression”) (Hanahan, 1983) se utilizó como medio enriquecido para el crecimiento óptimo de la bacteria tras la electroporación. Su composición es: 2% (p/v) bacto-triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 20 mM glucosa. El pH de este medio de cultivo se ajustó a 7,0 con una solución 5 M de NaOH.

El medio ISM (Intracellular Salts Medium) se utilizó para cultivar las bacterias simulando las concentraciones citoplásmicas de las células eucariotas (Headley y Payne, 1990). Su composición es: 170 mM PO_4K_3 , 0,5 mM SO_4Mg , 1 µM Cl_2Ca , 6 mM SO_4K_2 , 5 mM NaCl, 5 mM NH_4Cl y 2 mg/mL ácido nicotínico. El medio se tamponó a pH 7 con ácido ortofosfórico. Como fuente de carbono se usó 38 mM glicerol.

Para la preparación del caldo de fago P22 se emplearon los medios NB (“Nutrient Broth”), suplementado con NaCl, y el medio E. El medio NB se adquirió en forma de preparado comercial (Difco) y se preparó añadiendo 8 g del preparado y 5 g de NaCl a un litro de agua destilada. Su composición final es de 3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona y 5 g/L de NaCl. El medio E (Vogel y Bonner, 1956) se preparó como una solución de sales 50 veces concentrada (38 mM MgSO_4 ; 0,5 M ácido cítrico; 3,75 M K_2HPO_4 y 0,83 M $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$) y se esterilizó con cloroformo. El caldo de fagos se preparó mezclando 100 mL de medio NB, 2 mL de medio E 50x, 1 mL de glucosa al 20% (p/v) y 0,1 mL de un lisado de fago obtenido sobre una estirpe silvestre.

El medio EBU (“Evans Blue Uranine”) se utilizó para comprobar el estado de lisogenia en cepas obtenidas en ensayos de transducción. Su composición es la del medio LB al que se le añaden por cada 100 mL: 0,5 mL de glucosa al 50% (p/v); 1 mL K_2HPO_4 al 25% (p/v); 125 µL azul de Evans al 1% (p/v) y 250 µL de fluoresceína al 1% (p/v).

Todos los reactivos químicos utilizados son de grado analítico adquiridos en las casas comerciales Sigma, Merck y Fluka.

Los cultivos se realizaron rutinariamente en agitación suave (160-170 rpm) a 37 °C con una relación de matraz a volumen de cultivo de 10:1. Para los ensayos de infección de células eucariotas las bacterias se cultivaron en medio LB a 37 °C sin agitación para favorecer la expresión del flagelo bacteriano y, por tanto, la motilidad y contacto con la célula eucariota.

Cultivos de células eucariotas

Los fibroblastos NRK-49F y BJ-5ta se cultivaron en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Invitrogen). Para los fibroblastos NRK-49F el medio fue suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen) y 4 mM de L-glutamina (Invitrogen). En el caso de los fibroblastos humanos BJ-5ta, el medio fue suplementado con 10% (v/v) de SFB, 4 mM de L-glutamina y 2x medium 199 (Sigma). Para el crecimiento de las células epiteliales HeLa, se empleó medio mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 10% (v/v) de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1x NEAA (Nones-sential Amino Acids, Invitrogen) y 1 mM de piruvato sódico (Invitrogen).

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para la propagación de estas células, éstas fueron despegadas del soporte añadiendo 0,5% tripsina-EDTA (Invitrogen) e incubando durante 5 min. a 37°C. Una vez despegadas se diluyeron en su medio de cultivo habitual hasta conseguir la dilución adecuada en cada caso.

La líneas celulares se congelaron en criotubos (Nunc) en el medio de cultivo correspondiente, conteniendo 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), en nitrógeno líquido a una temperatura de -170°C, aproximadamente. Para descongelar las líneas celulares, el criotubo se sumergió en un baño de agua a 37°C. Posteriormente su contenido se deposito en placas Petri (Falcon) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Una vez adheridas las células al soporte, el medio con DMSO fue sustituido por medio nuevo.

GENÉTICA BACTERIANA

Inactivación de genes cromosómicos de *Salmonella*

Se empleó el protocolo de inactivación de genes cromosómicos en un sólo paso (Datsenko y Wanner, 2000). Para ello se procedió a la sustitución de la región co-

dificante del gen por un casete de resistencia a kanamicina (*kan*) o cloranfenicol (*cat*). En los casos en los que el gen a inactivar formaba parte de un operón se substituyó el operón completo por el casete de antibiótico. El gen o genes adyacentes también fueron substituidos por el casete cuando estaban a menos de 150 pb de la región codificante del gen a inactivar. Los oligonucleótidos usados para la inactivación de genes cromosómicos están descritos en la **Tabla A6 del anexo I**.

La correcta substitución del gen por el casete de resistencia a antibiótico fue confirmada por PCR. Comprobamos que los niveles de expresión de los genes adyacentes al gen o genes delecionados eran similares a los de la estirpe silvestre mediante RT-PCR semicuantitativa empleando el *kit* comercial *One-Step RT-PCR* de Qiagen.

En los casos en los que era necesario retirar el casete de antibiótico, se empleó el plásmido pCP20 que codifica la recombinasa FLP. Esta enzima elimina el casete de resistencia mediante la recombinación de los sitios FRT que lo flanquean, dejando en su lugar unos 80 pb de la secuencia FRT (Cherepanov y Wackernagel, 1995).

Etiquetado de proteínas de *Salmonella*

Se siguió el protocolo de etiquetado de genes en el cromosoma de *Salmonella* descrito anteriormente (Uzzau *et al.*, 2001). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la **Tabla A7 del anexo I** y el plásmido pSUB11, descritos en la **Tabla A5 del anexo I**, como ADN molde.

Construcciones genéticas mediante el protocolo con el plásmido pKO3 Blue

Para la construcción de estirpes con el epítipo de la hemoaglutinina (HA) dentro de la región codificante del gen o para la eliminación de un fragmento del gen se empleó el protocolo para la deleción e inserción de genes usando el plásmido pKO3 Blue descrito por Solano y colaboradores (Solano *et al.*, 2009). Este protocolo permite modificar secuencias génicas sin dejar restos de la secuencia FRT. Para etiquetar la proteína con el epítipo HA, se diseñaron oligonucleótidos que contenía secuencias homologas al gen de interés así como la secuencia del epítipo HA. Los oligonucleótidos empleados están descritos en las **Tablas A6 y A7 del anexo I**.

Electroporación de *S. enterica* y *E. coli*

Para la obtención de células electrocompetentes de *S. Typhimurium* se partió de un cultivo de bacteria crecido durante unas 18h a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) $\sim 3,0$. Se realizó una dilución 1:100 de este cultivo en 20 mL de medio LB.

Las bacterias se incubaron a 30°C o 37°C (según las características de la estirpe) en agitación hasta que la DO_{600} del cultivo alcanzó valores de 0,5-0,6. Seguidamente se centrifugó el cultivo durante 15 min. a 3.220 x g a 4°C. Tras resuspender las bacterias con 10 mL de agua destilada con 10% (v/v) de glicerol, se volvieron a centrifugar otros 15 min. a 3.220 x g a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol al 10% (v/v) a 4 y 2 mL respectivamente. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 200 μ L de agua con 10% (v/v) glicerol. Para realizar la electroporación se mezclaron 100 μ L de bacterias electrocompetentes con 100-200 ng de ADN en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BIO-RAD) previamente enfriada y se mantuvo en hielo hasta el momento de usarlas. A continuación, se sometió la mezcla a un pulso de 12,5 kV/cm (2,5 kV, 200 Ω y 25 μ F). Se agregó 1 mL de medio SOC, previamente precalentado a 37°C, a la cubeta. Esta mezcla se transfirió rápidamente a un tubo estéril que se incubó a 30°C o 37°C, según procediera, y se mantuvo en agitación durante 1 o 2 horas. Tras la incubación, la mezcla se sembró en medio selectivo con antibiótico.

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se partió de un cultivo crecido durante unas 18h y a una $DO_{600} \sim 3,0$. Se realizó una dilución 1:25 de este cultivo en 5 mL de LB. Tras crecer el a 37°C en agitación hasta obtener valores de DO_{600} de 0,5-0,6 las células se recogieron por centrifugación durante 10 min. (4.300 x g, 4°C). Se lavó el cultivo de bacterias dos veces con 1 mL de agua ultrapura fría, centrifugando durante 1 min. a 4.300 x g a 4°C cada vez. Se resuspendieron las bacterias en 1 mL de agua con 10% (v/v) de glicerol. Este procedimiento se repitió una vez mas disminuyendo el volumen a 80 μ L finales. La electroporación se realizó en las condiciones anteriormente descritas.

En caso de requerir un mayor volumen de células electrocompetentes, las cantidades citadas se incrementaron de manera proporcional.

Preparación de lisados de bacteriófagos P22

Para preparar el lisado de una estirpe concreta, se mezclaron 4 mL de caldo de P22 con 1 mL de un cultivo de la estirpe donadora crecido durante unas 18h a 37°C en agitación. Esta mezcla se cultivó en agitación suave (100 rpm) durante 8h a 37°C. Los bacteriófagos se recogieron mediante centrifugación del lisado durante 20 min. a 3.220 x g y 4°C. El sobrenadante se recogió en un tubo al que se le añadió 0,1 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente. Los lisados se almacenaron a 4°C.

Transducción en medio líquido

Para la construcción de estirpes mutantes de *Salmonella* con marcadores cromosómicos se utilizó el bacteriófago P22. En un tubo se mezclaron 200 μL de un cultivo de la estirpe receptora, crecido durante unas 18h a 37°C en agitación, con 200 μL del lisado de P22 de la estirpe donadora. Después de 30 min. de agitación suave (150 rpm) a 37°C, esta mezcla se sembró en placas de LB-agar en medio selectivo para el marcador utilizado y se incubaron a 37°C hasta la aparición de transductantes.

Para comprobar que los transductantes estaban libres del bacteriófago se sembraron cuatro colonias en placas de medio EBU (Chan *et al.*, 1972). Se considera que un transductante está limpio de bacteriófago cuando en el aislamiento no aparece ninguna colonia de color azul oscuro.

MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracción de ADN genómico

Partimos de 1,5 mL de cultivo de bacterias crecidas en LB en fase estacionaria (aproximadamente a una DO_{600} de 3,0 equivalente a $\sim 10^{10}$ bacterias/mL). Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 560 μL de tampón TE (10mM Tris-HCL, 1mM Na_2EDTA , pH 8,0). Tras añadir 30 μL de SDS al 10% (p/v) y 3 μL de Proteinasa K (20 mg/mL), la mezcla se incubó 1h a 37°C para lisar las células. Posteriormente, se añadieron 100 μL de NaCl 5M y 80 μL de CTAB/NaCl [10% (p/v) bromuro de cetil-trimetil amonio / 0,7 M NaCl] previamente calentado a 65°C, para eliminar los restos bacterianos. Para purificar el ADN se añadieron 700 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), separándose por centrifugación (20.000 x g, 5 min., 4°C). Las fases superior e intermedia se recogieron y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y el ADN fue precipitado con etanol absoluto frío en una proporción 1:2 (v/v). Se lavó con etanol al 70% (v/v) y se secó al aire. Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en agua estéril. La cantidad y calidad del ADN fue medida en el espectrofotómetro NanoDrop Modelo ND-1000 (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -20°C.

Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó usando el *kit* comercial Wizard-Plus SV Minipreps (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de ARN.

Para la obtención de ARN de cultivos de *Salmonella* se crecieron las estirpes correspondientes en medio LB y se recogieron los cultivos en fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} \sim 0,2$). El volumen del cultivo correspondiente a 2 unidades de DO_{600} se transfirió a un tubo conteniendo una mezcla de fenol y etanol a una concentración final de 5 y 95% (v/v), respectivamente (McDowall *et al.*, 1994). Tras una incubación en hielo durante 30 min., las bacterias se recogieron por centrifugación ($3.220 \times g$, 10 min., $4^{\circ}C$) y se procesó con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Finalmente, con el ARN bacteriano obtenido se realizó un tratamiento con TURBO DNA-free (Ambion) para eliminar los posibles restos de ADN genómico de la muestra.

Digestión y ligación de fragmentos de ADN

En este trabajo sólo se emplearon las endonucleasas de restricción BamH I y Dpn I (20.000 U/mL) (New England BioLabs). En cada caso se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante. En la digestión del plásmido pKO3 Blue con la enzima BamH I se añadió 0,4 U de la enzima fosfatasa alcalina (Roche) para evitar la recircularización del plásmido.

Para las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se usó la ligasa T4 de New England Biolabs. La mezcla de ligación se incubó durante 12h a $4^{\circ}C$. Posteriormente se purificó la ligación con el kit de Pellet Paint NF Co-Precipitant (Novagen).

Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN fueron analizadas por electroforesis en geles de entre 1-2% (p/v) de agarosa (según el tamaño del producto de PCR) al que se añadió el agente de tinción de ácidos nucleicos GelRed (1x) (Biotium), y se migraron entre 90 y 110 V. Se utilizaron como marcadores la escalera de 1 kb de DNA o el marcador de 100 pb de Promega, según el tamaño del producto de PCR.

Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN mayores de 0,5 kilobases (kb) se extrajeron cortando la zona del gel de agarosa marcada con el agente de tinción en el tamaño correspondiente a la muestra. Los fragmentos de gel obtenidos que contenían la muestra fueron purificados con el *kit* PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (nº de catálogo: K2100-12, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa

Los insertos para generar mutantes se construyeron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando la polimerasa Expand High Fidelity (EHF) (3.500 U/mL) (Roche). Para la comprobación de las colonias transformadas se empleó la polimerasa Taq Gold (5.000 U/mL) (Roche). A la polimerasa correspondiente se añadió el ADN molde y una mezcla de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador PCT-100™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc.).

SECUENCIACIÓN

Secuenciación del ADN

Los fragmentos de ADN fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid (<http://www.fpcm.es/>).

Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de las secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el paquete de análisis de DNASTAR Inc.

INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES CON *Salmonella*

Determinación de la tasa de invasión e índice de proliferación intracelular

Para los ensayos de infección, las bacterias se cultivaron en medio LB a 37°C, durante 18h y sin agitación. Las células epiteliales o los fibroblastos (~10⁵ células/pocillo) se sembraron utilizando placas de 24 pocillos (2 cm²) (Falcon) en el medio correspondiente y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 24h, cuando el cultivo había alcanzado una confluencia del 50-60%, las células eucariotas se infectaron con la correspondiente estirpe de *S. Typhimurium* a una multiplicidad de infección de 10:1 (bacteria:célula eucariota). El número de bacterias viables del inóculo fue calculado sembrando diluciones seriadas en placas LB-agar y contando el número de colonias. Tras 20 min. de infección para fibroblastos NRK-49F y 10 min. de infección para células HeLa, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células eucariotas dos veces con la solución tamponada fosfato salina (PBS) pH 7,4 estéril a 37°C. Seguidamente, se añadió medio de cultivo nuevo a 37°C suplementado con 100 µg/mL de gentamicina (Sigma). A las 2h post-infección se volvió a añadir medio nuevo, esta vez conteniendo 10 µg/mL de gentamicina. Este antibiótico sólo elimina las bacterias

extracelulares sin afectar a la viabilidad de aquellas que se encuentran en el interior de las células eucariotas (Finlay y Falkow, 1988). A las 2 y 24 horas post-infección, las células eucariotas infectadas se lavaron tres veces con la solución salina equilibrada de Hank (HBSS, Invitrogen) y se lisaron con una solución estéril compuesta por 1% (v/v) de Triton X-100 y 0,1% de SDS (p/v) en PBS durante 2 min. a 37°C. El número de las bacterias intracelulares viables se determinó sembrando distintas diluciones del lisado en placas de LB-agar y contando el número de colonias. Para cada estirpe y tiempo se infectaron 2 pocillos y el lisado de cada pocillo se sembró por duplicado. La tasa de invasión se calculó como el número de bacterias intracelulares viables a 2h con respecto al número de bacterias viables inoculadas. El índice de proliferación intracelular se calculó como el cociente entre el número de las bacterias intracelulares viables a las 24h con respecto a las 2h post-infección. Este ensayo se realizó un mínimo de tres veces.

Para los ensayos de infección con suplementación de hierro, tanto las bacterias como las células eucariotas se cultivaron durante 18h con medio suplementado con 60 μM FeCl_3 . Las células eucariotas, tanto las suplementadas con 60 μM FeCl_3 como las no suplementadas, fueron infectadas con bacteria crecida en medio con 60 μM FeCl_3 o en medio LB sin suplementar. En todo momento, el medio celular que era remplazado contenía la misma concentración de FeCl_3 .

Obtención de bacteria intracelular en ensayos de infección de células eucariotas

Para la obtención de bacterias intracelulares se optimizó el protocolo descrito para la infección de macrófagos J774.A1 por *Salmonella* (Eriksson *et al.*, 2003). Se sembraron $\sim 2,5 \times 10^7$ células eucariotas en 50 mL de medio en 4 placas de cultivo de 500 cm^2 de superficie (Nunc) y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 . El número de placas empleadas fue ajustado según el índice de proliferación de la cepa bacteriana con la que se infectaba, siendo el doble para las cepas con disminución de supervivencia intracelular y la mitad para las cepas con un incremento en la proliferación intracelular. Tras 24h, cuando las células alcanzaron una confluencia de un 60-70% ($\sim 3,7 \times 10^7$ células), fueron infectadas con las estirpes correspondientes de *S. Typhimurium*. Tras 30 min. de infección, las células se lavaron tres veces con HBSS y se añadió medio nuevo suplementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, todo ello precalentado a 37°C. Una hora después, se volvió a añadir medio nuevo con 10 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. A los tiempos post-infección establecidos para cada caso, el cultivo fue lavado con HBSS

y las células eucariotas fueron lisadas agregando 20 mL de una solución cuya composición es 1% (v/v) de fenol, 19% (v/v) de etanol y 0,4% (p/v) de SDS. A partir de aquí, el lisado se mantuvo a 4°C y se transfirió a tubos de polipropileno de 50 mL (Sorvall), donde se centrifugó (25.000 x g durante 30 min. a 4°C) para obtener las bacterias intracelulares. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento de bacterias intracelulares se lavó dos veces utilizando 1 mL y 200 µL, respectivamente, de solución de lavado [1% (v/v) de fenol y 19% (v/v) etanol], centrifugando durante 10 min. a 11.300 x g a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

Proteínas totales de *Salmonella* en medios de cultivo

Las bacterias se crecieron en diferentes medios de cultivo a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento ($DO_{600} \sim 3,0$). Se recogieron por centrifugación (20.000 x g, 5 min. a temperatura ambiente) y fueron resuspendidas con 75 µL de PBS y 25 µL de tampón Laemmli 4x [concentración final: 1,3% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 50 mM Tris-HCL, 1,8% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,02% (p/v) azul de bromofenol, pH 6,8]. Las muestras se calentaron a 97°C durante 5 min. y fueron centrifugadas (14.100 x g, 5 min. a temperatura ambiente) para retirar restos de peptidoglicano y ADN. En los geles de acrilamida se cargó un volumen de 10 µL/pocillo del sobrenadante. El remanente se conservó a -20°C.

Proteínas totales de *Salmonella* intracelular

El sedimento de bacterias intracelulares de cuatro placas fue resuspendido en PBS y llevado a un volumen final de 32 µL con PBS y tampón Laemmli 4x. Las muestras se calentaron a 97°C durante 5 min. y fueron centrifugadas (14.100 x g, 5 min.). En los geles de acrilamida se cargó un volumen de 10 µL/pocillo del sobrenadante. Como control de carga se detectaron las chaperonas bacterianas GroEL o DnaK.

INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (ensayos de “Western Blot”)

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles del 8%, 12% y 15% de poli(acrilamida-glicina)-SDS, según el tamaño de la proteína a detectar, y tampón Tris-glicina-SDS. Se utilizó el equipo Mini-Protean 3 Cell (BIO-RAD) y una fuente Power Pac (BIO-RAD) para la electroforesis. Consecutivamente, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinildeno difluorado (PDVF, Immobilon-P Millipore) humedecidas en metanol y equilibradas en 48 mM de Tris-HCl, 39 mM de glicina, 0,036% (p/v) de SDS y 20% (v/v) metanol a pH 8,5. La transferencia se realizó en un aparato Trans-

Blot® Semi-Dry de BIO-RAD durante 1h a 15 V. Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon con 3% (p/v) de leche desnatada diluida en TBS-T (20 mM de Tris-HCl a pH 7,5; 150 mM de NaCl con 0,1% (v/v) de Tween-20) durante al menos una hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBS-T durante aproximadamente 18h a 4°C. Después de lavar las membranas durante 5 min. tres veces con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en TBS-T 1h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con TBS-T. La posición y cantidad relativa de las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron mediante el ensayo de quimioluminiscencia basado en la reacción cumarico-luminol (Iwata *et al.*, 1995).

MICROSCOPIA DE INMUNOFLOURESCENCIA

Las células epiteliales y los fibroblastos se sembraron en 0,5 mL de medio ($\sim 10^5$ células/pocillo) utilizando placas de 24 pocillos (Falcon) sobre lentillas de 12 mm de diámetro y se infectaron con las estirpes de *S. Typhimurium* correspondientes. A los diferentes tiempos post-infección se lavaron las células eucariotas tres veces con 0,5 mL de HBSS a 37°C y se fijaron en 250 μ L de paraformaldehído (PFA) [3% (p/v) PFA en PBS, pH 7,4] durante 10 min. a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células, éstas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo [2% (v/v) de suero de cabra (Sigma) en PBS] durante 10 min. a temperatura ambiente. Seguidamente las células se incubaron con los anticuerpos primarios a su dilución correspondiente en una solución con 2% (v/v) de suero de cabra (Sigma) y 0,2% (v/v) de saponina (Sigma) en PBS durante 1h a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se hicieron tres lavados con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios diluidos 1:1000 en una solución similar a la de los anticuerpos primarios, incubando de nuevo una hora a temperatura ambiente. Los núcleos se marcaron con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) 0,5 μ g/mL durante 10 min. Finalmente, tras lavar las lentillas, se montaron en un portaobjetos con Prolong Gold Antifade (Molecular Probes) y se sellaron con esmalte de uñas.

ANÁLISIS DE LOS DATOS DE TRANSCRIPTÓMICA

Para el análisis de los resultados de transcriptómica obtenidos con el microsoporte SALGENOMICS (Núñez-Hernandez, 2008) se utilizaron dos programas: FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>), para visualizar gráficamente los resultados al aplicar diferentes filtros estadísticos a los valores de M (Oliveros, 2007); y

BioCyc.org 16.0 (<http://biocyc.org>), para la visualización esquemática de las rutas metabólicas de *S. Typhimurium* con los diferentes valores de M (Becker *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos de todos los datos de este trabajo se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc.). A los valores normalizados de los experimentos se aplicó el test estadístico ANOVA de una vía con un post-test de Dunnet.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1.

Búsqueda de funciones de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que contribuyen al estado no proliferativo intracelular en fibroblastos

La capacidad adaptativa de las bacterias a los cambios en el ambiente es fundamental para su supervivencia. En el caso de bacterias patógenas intracelulares, como las que integran el género *Salmonella*, esta adaptación al ambiente de la célula eucariota cobra una mayor importancia. Durante los últimos años, los avances en técnicas de análisis global en *S. enterica* han permitido comparar perfiles de expresión de genes bajo diferentes condiciones de crecimiento, tanto en modelos animales de ratón (Becker *et al.*, 2006) como en líneas celulares epiteliales o de macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003; Faucher *et al.*, 2006; Hautefort *et al.*, 2008). Otra práctica común es el estudio de la expresión de proteínas bajo condiciones de crecimiento en medio de cultivo que mimetizan la situación de crecimiento *in vivo* (Sonck *et al.*, 2009; Encheva *et al.*, 2009). Este tipo de estudios han proporcionado un primer indicio a la hora de identificar los genes involucrados en la virulencia de *S. enterica* (Thompson *et al.*, 2006). No obstante, *S. Typhimurium* prolifera en la mayoría de las líneas celulares empleadas comúnmente en los ensayos *in vitro*, mientras que *in vivo* no supera las 3-4 bacterias por célula (Geddes *et al.*, 2007; Helaine *et al.*, 2010; Salcedo *et al.*, 2001). Esta discrepancia entre algunos modelos *in vitro* y la situación *in vivo* nos hizo considerar la posibilidad de que el modelo de fibroblastos reflejara mejor esta situación.

En nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio de transcriptómica de *S. enterica* serovar Typhimurium en infección de fibroblastos NRK-49F (Núñez-Hernandez, 2008). En el fibroblasto, *S. Typhimurium* atenúa el crecimiento utilizando reguladores propios como el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Cano *et al.*, 2001; Martínez-Moya *et al.*, 1998). Las comparaciones realizadas en este estudio comprendían básicamente la utilización de la estirpe silvestre y el mutante *phoP*. En el ambiente extracelular (medio LB), se eligió la fase estacionaria como una fase de no crecimiento y la fase exponencial como fase de crecimiento (**Fig 2**). Este estudio incluía datos de expresión por duplicado para cada gen. Los duplicados correspondían a dos oligonucleótidos idénticos de cada gen impresos en sitios distintos del microsoporte. Es importante indicar que los transcriptomas de la estirpe silvestre y el mutante *phoP* en fase exponencial mostraron una similitud significativa. Así, sólo los valores de los genes *phoP*, *ybjD* e *ybjX* mostraron cambios superiores a 4 veces en sus valores de expresión de un total de 4.369 genes representados en el microsoporte (Núñez-Hernández *et al.*, 2012) (**Fig. 2**).

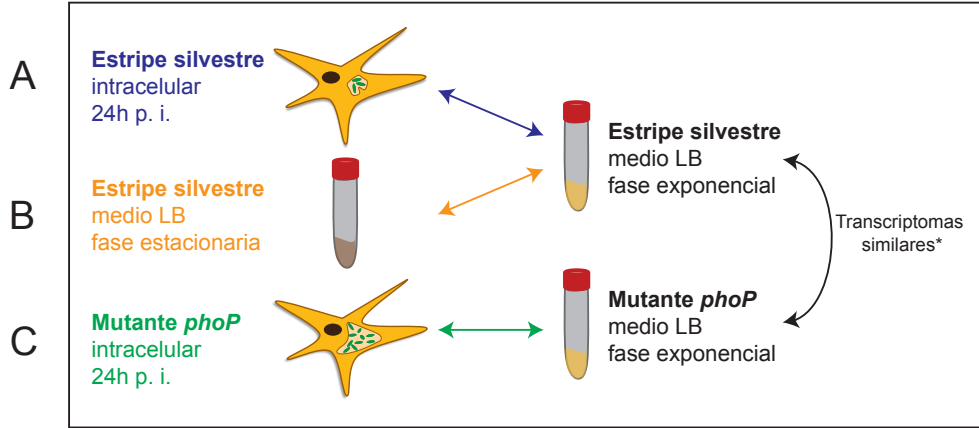


Figura 2. Esquema de las diferentes condiciones de crecimiento comparadas en los estudios globales de expresión génica de *S. Typhimurium* realizados en nuestro laboratorio. (*) Sólo 3 genes de un total de 4.369 mostraron cambios en los valores de expresión.

Con el objeto de identificar los genes inducidos por *S. Typhimurium* durante el estado no proliferativo en el interior de fibroblastos, realizamos un nuevo análisis de los datos obtenidos en nuestro laboratorio diferenciando los siguientes grupos:

Grupo I. Genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular al menos cuatro veces ($M \geq 2$) y en **ambos duplicados del microsoporte**. Obtuvimos así un conjunto de 56 genes (**Fig. 3**) (**Tabla A8 del anexo II**).

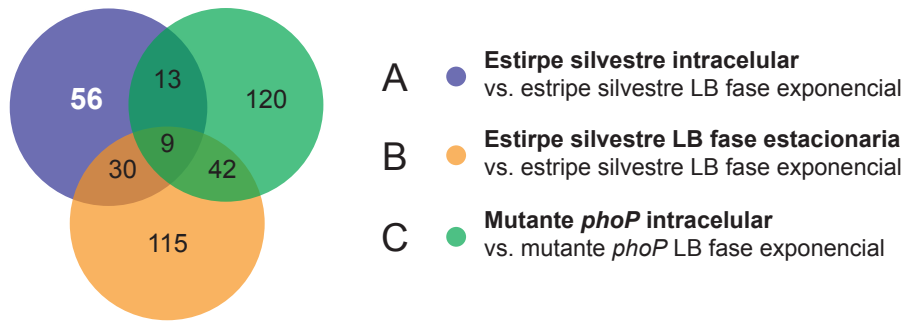


Figura 3. Distribución de genes inducidos más de cuatro veces ($M \geq 2$) comunes y específicos de las condiciones descritas en la figura 2 (A, B y C).

Grupo II. Decidimos ampliar el criterio de selección con el fin de no descartar a priori candidatos que pudieran contribuir a la persistencia de *S. Typhimurium* pero que no estuvieran inducidos en mayor grado. Seleccionamos así genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular al menos tres veces ($M \geq 1,5$) y en **ambos duplicados del microsoporte**. Obtuvimos de este modo un total de 22 genes que presentaban valores de expresión relativa de $2 \geq M \geq 1,5$ (**Tabla A9 del anexo II**).

Grupo III. Nuevamente ampliamos el criterio de selección con el objeto de no descartar posibles candidatos. En este grupo incluimos genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular, al menos cuatro veces ($M \geq 2$) en uno de los duplicados, mientras que el otro duplicado presentaba valores de expresión relativa superiores a 0. Obtuvimos así un total de 33 genes (**Tabla A10 del anexo II**).

Grupo IV. En este grupo incluimos aquellos genes que se encontraban inducidos al menos 4 veces ($M \geq 2$) **tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *phoP***. Obtuvimos así un total de 13 genes (**Tabla A11 del anexo II**) (**Fig. 3**).

Dado que el total de genes seleccionados en los cuatro grupos era demasiado elevado para poder analizarlos genéticamente de forma individual, decidimos inactivar dentro de cada grupo los siguientes genes:

Grupos I y II. Genes de función desconocida, genes metabólicos, genes presentes exclusivamente en *Salmonella* y genes relacionados con situaciones de estrés nutricional. En base a estos criterios construimos un total de 24 mutantes para el grupo I y 2 mutantes para el grupo II (**Tabla 1**).

Grupo III. Genes que se encontraban reprimidos ($M \leq -2$) en el mutante *phoP* y en la bacteria extracelular en fase estacionaria. En base a este criterio construimos 7 mutantes, detallados en la **tabla 1**.

Grupo IV. Genes relacionados con situaciones de estrés. Construimos así 2 mutantes adicionales (**Tabla 1**).

Tabla 1. Genes seleccionados a partir de los grupos I, II, III, IV que fueron deleccionados para el posterior análisis de mutantes en el modelo de fibroblastos.

GRUPO I		
Nombre del gen	Función	Región deleccionada
STM0054	Probable oxalacetato descarboxilasa, subunidad β	STM0054-STM0056
STM0056	Probable oxalacetato descarboxilasa, subunidad γ	
STM0494	<i>ushA</i> UDP-azucar hidrolasa/5'-nucleotidasa	STM0494
STM0719	Probable UDP-galactopiranososa mutasa	STM0719-STM0721
STM0812	<i>ybhO</i> Cardiolipin sintetasa	STM0812
STM0965	<i>dmsB</i> Dimetil sulfóxido reductasa anaeróbica, subunidad β	<i>dmsABC</i>
STM1499	Probable dimetil sulfóxido reductasa, cadena A1	STM1499
STM2285	<i>glpB</i> Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa anaeróbica, subunidad β	<i>glpQTABC</i>
STM3475	<i>nirD</i> Nitrito reductasa, subunidad pequeña	<i>nirB-nirD</i>
STM4084	<i>fpr</i> Ferredoxin-NADP reductasa	<i>fpr</i>
STM4377	<i>aidB</i> Probable acil-CoA deshidrogenasa	STM4377
STM4467	Probable arginina desiminasa	STM4466-STM4467
STM0279	Probable proteína citoplásmica	STM0279
STM0581	Probable proteína reguladora	STM0581
STM0717	Probable proteína de membrana interna	STM0717-STM0718
STM1020	Proteína hipotética STM1020	STM1020
STM2054	<i>pduT</i> Proteína de cuerpo polihédrico	<i>pduF-yeeX</i>
STM2139, 2n	Proteína hipotética STM2139,2n	STM2139, 2n
STM2461	<i>eutG</i> Probable proteína transportadora	<i>eutR-S</i>
STM2470	<i>eutS</i> Probable proteína estructural del carboxisoma	
STM2981	<i>ygdD</i> Proteína hipotética STM2981	<i>ygdED-gcvA</i>
STM3558	"death-on-curing protein"	STM3558-yhhV
STM3808,S	<i>ibpB</i> Proteína pequeña de estrés por calor	<i>ibpB</i>
STM3847	<i>yidY</i> Probable proteína transportadora	<i>yidYZ</i>
STM4075	<i>ydeY</i> Probable transportador de azucar	<i>ego-STM4080</i>
STM4205	Probable glicosiltransferasa de bacteriófago	STM4204-STM4206
GRUPO II		
Nombre del gen	Función	Región deleccionada
STM3340	<i>yhck</i> Regulador transcripcional NanR	<i>yhck</i>
STM3625	<i>yhjV</i> Probable proteína de transporte	<i>yhjV</i>
GRUPO III		
Nombre del gen	Función	Región deleccionada
STM0761	Fumarato hidratasa	STM0761-STM0762
STM1793	Probable citocromo oxidasa, subunidad II	STM1792-STM1794
STM3583	<i>acpT</i> Probable fosfopantetenil transferasa	<i>acpT</i>

a) Metabólicos

b) No metabólicos

Tabla 1 (continuación). **Genes seleccionados a partir de los grupos I, II, III, IV que fueron delecionados para el posterior análisis de mutantes en el modelo de fibroblastos.**

<i>STM3827</i>	<i>dgoT</i>	Trasportador de D-galactonato	<i>dgoT</i>
<i>STM1764</i>	<i>narG</i>	Nitrato reductasa tipo 1	<i>narGHJI</i>
<i>STM1577</i>	<i>narZ</i>	Nitrato reductasa tipo 2	<i>narZYWV</i>
<i>STM2259</i>	<i>napA</i>	Nitrato reductasa periplásmica	<i>napFDAGH</i>
GRUPO IV			
Nombre del gen		Función	Región delecionada
<i>STM1686</i>	<i>pspE</i>	Proteína de estrés en respuesta a bacteriófago	
<i>STM1688</i>	<i>pspC</i>	Proteína de estrés en respuesta a bacteriófago	<i>pspEDCBAF</i>
<i>STM1689</i>	<i>pspB</i>	Proteína de estrés en respuesta a bacteriófago	
<i>STM1882</i>	<i>yebG</i>	Proteína inducible por daño en el ADN	<i>yebGFE</i>

En resumen, seleccionamos un total de 124 genes a partir de los cuales construimos 35 mutantes (**Tabla 2**).

Tabla 2. Número de genes seleccionados en los grupos I, II, III, IV y número de mutantes generados en cada uno de ellos.

	Nº total de genes seleccionados	Nº de mutanes construidos
Grupo I	56	24
Grupo II	22	2
Grupo III	33	7
Grupo IV	13	2
	124	35

A partir de esta selección, estudiamos la capacidad invasiva y proliferativa de cada uno de estos mutantes durante la infección de fibroblastos NRK-49F.

1.1 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular en la condición de no crecimiento (Grupo I)

Para una mejor visualización de los datos, los mutantes generados en el grupo I se subdividieron según la función de las proteínas que codifican. En un grupo incluimos los genes relacionados directamente con el metabolismo central bacteriano

(11 mutantes; **Tabla 1**); y en el otro grupo incluimos los genes “no metabólicos” que codifican proteínas que intervienen en otro tipo de procesos, proteínas de función desconocida y proteínas estructurales (13 mutantes; **Tabla 1**).

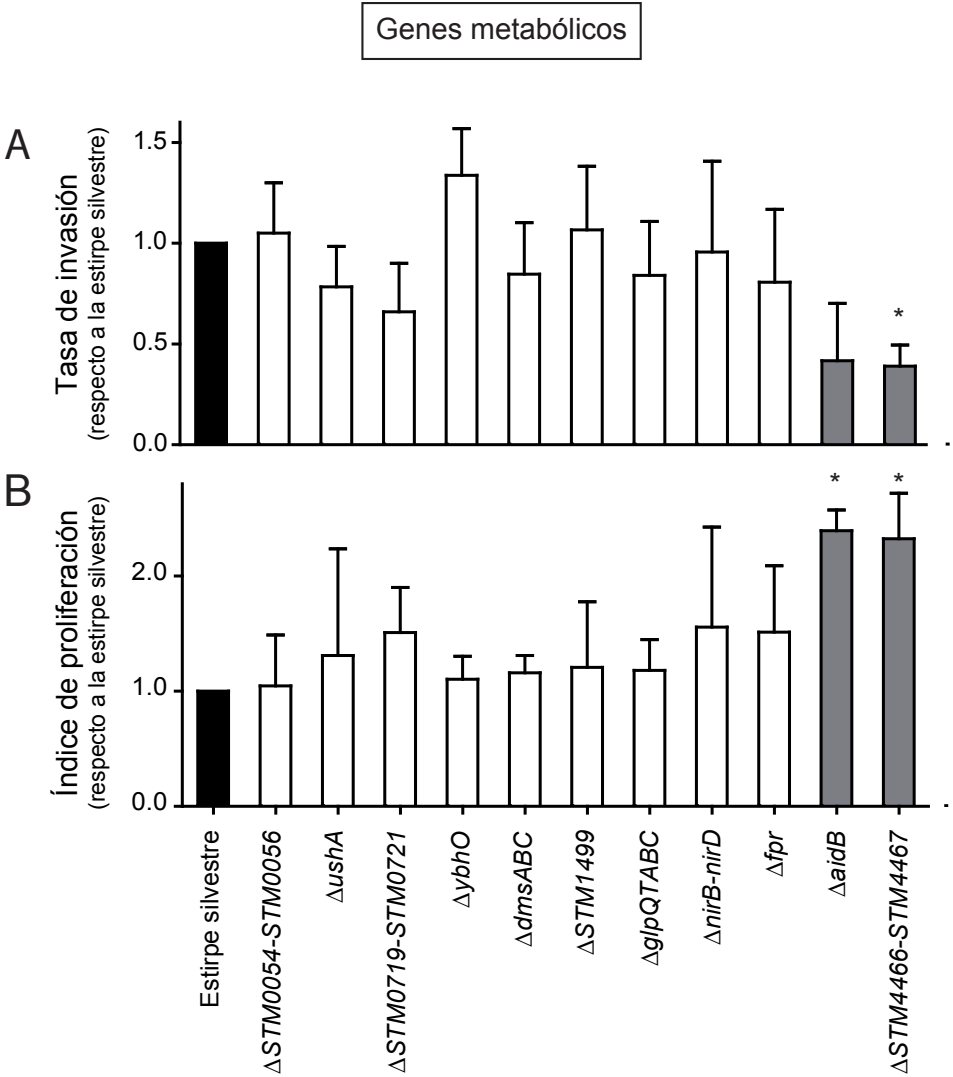


Figura 4. Los mutantes $\Delta STM4466$ -STM4467 y $\Delta aidB$ de *S. Typhimurium* presentan cambios en la invasión y/o proliferación en fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24h y 2h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes de *S. Typhimurium* (indicados en la Tabla 1) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,58 \pm 0,19$ y $1,61 \pm 1,07$. * $p < 0,05$

a) Genes implicados en metabolismo intermediario

Los ensayos de infección realizados en fibroblastos NRK-49F con mutantes deficientes en genes metabólicos mostraron diferencias estadísticamente significativas en dos de los once mutantes ensayados. Uno de ellos es el mutante carente de los genes *STM4466* y *STM4467* que codifican enzimas con probable actividad carbamato quinasa y arginina desiminasa, respectivamente (**Fig. 4**). Este mutante mostró una tasa de invasión (n° viables a 2h/ n° viables en el inóculo) un 60% menor que la estirpe silvestre (**Fig. 4A**), y un índice de proliferación (viables a 24h/ viables a 2h) más de dos veces superior al de la estirpe silvestre (**Fig. 4B**). No obstante el número absoluto de bacterias intracelulares viables del mutante obtenidas a 24h fue similar al de la estirpe silvestre (**Fig. 5A**). Por lo tanto, la mayor tasa de proliferación podría ser provocada por la menor tasa de invasión que presenta el mutante $\Delta STM4466$ -*STM4467*.

Otro mutante que también mostró cambios en los parámetros de infección analizados fue $\Delta aidB$. Este gen codifica una probable acil-CoA deshidrogenasa. El mutante $\Delta aidB$ presentó un índice de proliferación más de dos veces superior al de la estirpe silvestre (**Fig. 4B**). En este caso, el número de bacterias intracelulares viables del mutante a 24h se aproximó a la estirpe silvestre, alcanzando aproximadamente el 60% del número de viables de la estirpe silvestre frente a un 27% a 2h (**Fig. 5B**).

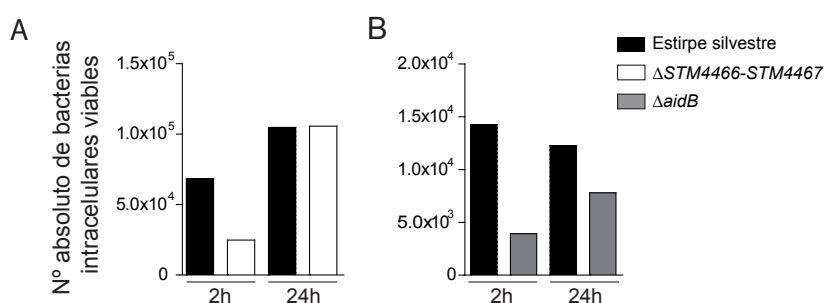


Figura 5. Los mutantes $\Delta STM4466$ -*STM4467* y $\Delta aidB$ de *S. Typhimurium* alcanzan un número de bacteria intracelular a 24h similar a la estirpe silvestre. Número absoluto de bacterias viables de la estirpe silvestre SV5015 y de los mutantes $\Delta STM4466$ -*STM4467* y $\Delta aidB$ de *S. Typhimurium* en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes.

b) Genes “no metabólicos”

Dos de los 13 mutantes encuadrados en el grupo de genes “no metabólicos” ($\Delta STM0279$ y $\Delta STM1020$) presentaron un fenotipo claro durante la infección de fibroblastos NRK-49F. El mutante $\Delta STM0279$, deficiente en una probable proteína citoplasmática, presentó un 30% menos de invasión que la estirpe silvestre (Fig. 6A). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en su índice de prolifera-

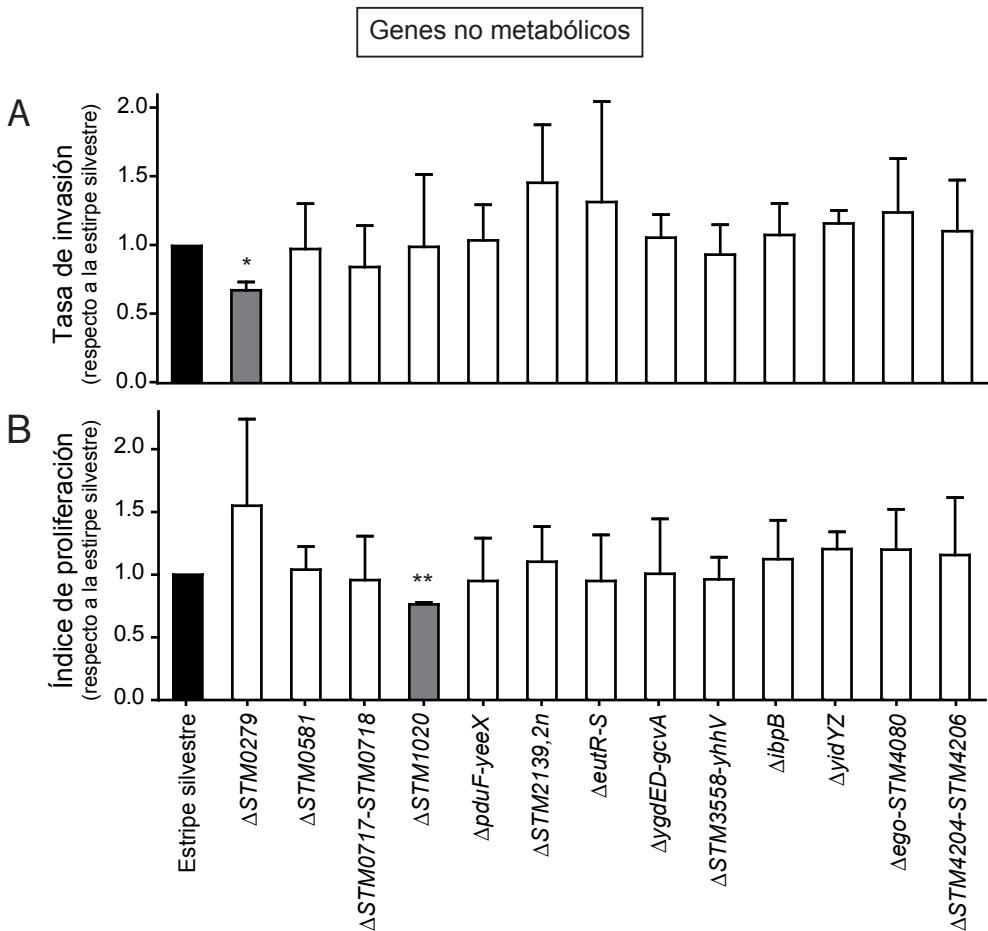


Figura 6. Los carencia de los genes *STM0279* y *STM1020* provoca cambios en la invasión y/o proliferación intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24 h y 2 h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes de *S. Typhimurium* (indicados en la Tabla 1) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,64 \pm 0,2$ y $1,51 \pm 1,04$, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

ción con respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 6B**). Al contrario, el mutante $\Delta STM1020$, de función desconocida, no presentó cambios estadísticamente significativos en la tasa de invasión (**Fig. 6A**), pero sí mostró un índice de proliferación ligeramente menor en comparación a la estirpe silvestre (0,76 frente a 1,00) (**Fig. 6B**).

El estudio a nivel microscópico de los mutantes $\Delta STM4466$ - $STM4467$ y $\Delta aidB$ descartó deficiencias en la localización, morfología y alteraciones en la tasa de crecimiento a nivel de célula individual (**Fig. 7**).

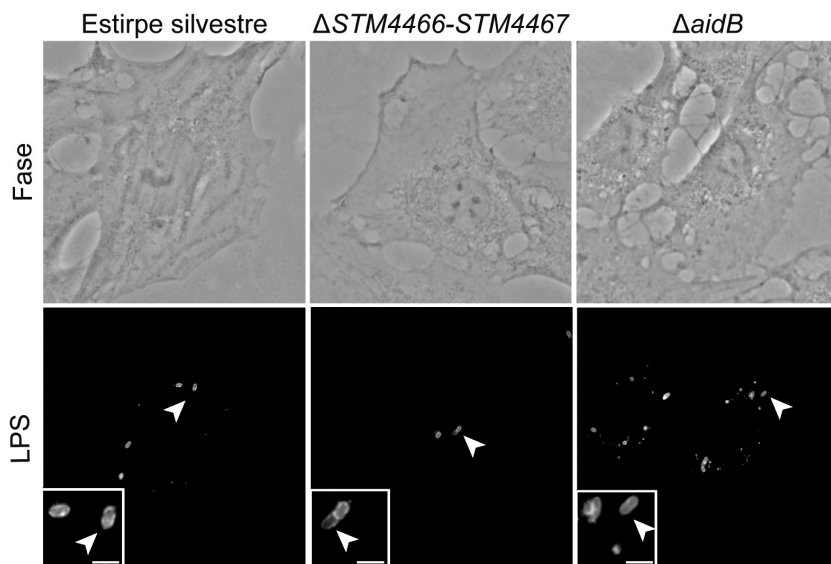


Figura 7. La ausencia de los genes $STM4466$ - $STM4467$ y $aidB$ no altera la morfología, localización ni la tasa de proliferación intracelular de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos NRK-49F. Las células fueron infectadas con la estirpe silvestre SV5015 o con los mutantes $\Delta STM4466$ - $STM4467$ y $\Delta aidB$. Tras 24h de infección se detectó la bacteria intracelular empleando un anticuerpo policlonal anti-LPS. Las cabezas de flechas indican las bacterias que aparecen en los paneles ampliados. Las barras de escala de los paneles ampliados representan los 2 μ m de longitud.

El incremento en la proliferación intracelular observado en los mutantes $\Delta STM4466$ - $STM4467$ y $\Delta aidB$ (**Fig. 4**) no llegó a ser en ningún caso superior a 2-3 veces. Este incremento no es relevante si lo comparamos con el mutante *phoP*, que llega a alcanzar un índice de proliferación unas 40 veces superior al de la estirpe silvestre (Cano *et al.*, 2001). De forma análoga, la supervivencia intracelular del mutante $\Delta STM1020$ (**Fig. 6**) no se vio tan drásticamente disminuida como en el caso de los mutantes *rpoE* o *spiA*, en los que disminuye ~70% respecto a la estirpe silvestre (Cano *et al.*, 2001).

El fenotipo observado en los mutantes $\Delta STM4466$ - $STM4467$, $\Delta aidB$ y $\Delta STM0279$ ensayados en fibroblastos (**Fig. 4 y 6**), indicarían que las deficiencias en estos genes podrían alterar las funciones de invasión. Por otro lado, el hecho de que el número de bacterias viables alcanzado por estos mutantes a 24h sea similar al de la estirpe silvestre (**Fig. 5**) apoya la idea de que estos genes son dispensables para el control del crecimiento intracelular.

1.2 Análisis de genes inducidos más de tres veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular en la condición de no crecimiento (Grupo II)

Los dos mutantes carentes de los genes seleccionados en el grupo II ($M \geq 1,5$) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de invasión ni en el índice de proliferación (**Fig. 8A y B**).

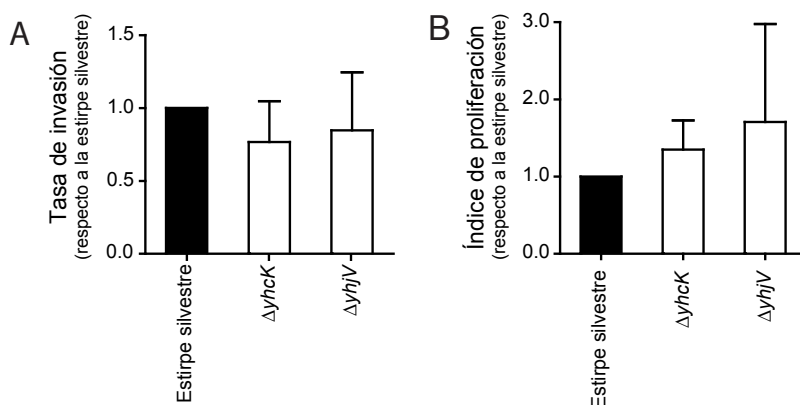


Figura 8. La carencia de los genes *yhcK* e *yhjV* no afecta a la invasión ni a la proliferación de *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2 h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24 h y 2 h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes de *S. Typhimurium* (indicados en la Tabla 2) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$) Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,56 \pm 0,26$ y $1,7 \pm 0,61$, respectivamente.

1.3 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces exclusivamente en la estirpe silvestre intracelular y reprimidos más de cuatro veces en el mutante *phoP* y en la estirpe silvestre extracelular (Grupo III)

Ninguno de los mutantes pertenecientes al grupo III presentó cambios fenotípicos estadísticamente significativos durante la infección de fibroblastos NRK-49F.

No obstante, tanto la capacidad invasiva del mutante $\Delta acpT$ como la supervivencia intracelular del mutante $\Delta napFDAGH$ podrían estar afectadas (**Fig. 9A y B**). Asimismo, la tasa de invasión del mutante $\Delta STM1792-STM1794$ podría estar ligeramente incrementada con respecto a la de la estirpe silvestre, aunque el análisis estadístico no reveló cambios significativos.

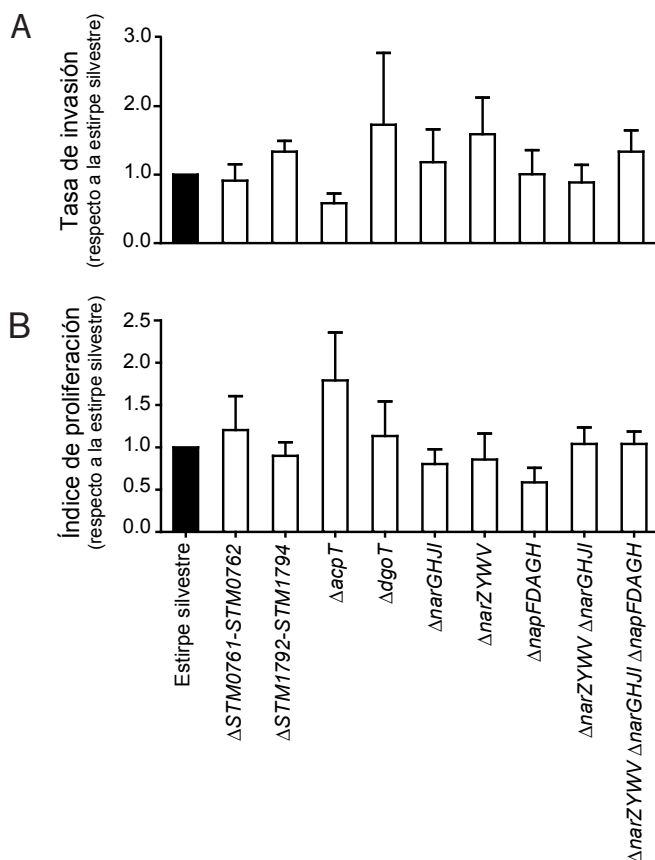


Figura 9. La carencia de genes del grupo III no afecta a la invasión ni a la proliferación de *S. Typhimurium* en fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24 h y 2 h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes de *S. Typhimurium* (indicados en la Tabla 1) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,56 \pm 0,15$ y $0,86 \pm 0,3$, respectivamente.

1.4 Análisis de genes inducidos más de cuatro veces en la estirpe silvestre y el mutante *phoP* durante la infección de fibroblastos NRK-49F (Grupo IV)

Los ensayos de infección realizados con los dos mutantes generados en este grupo no mostraron diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 10A y B**).

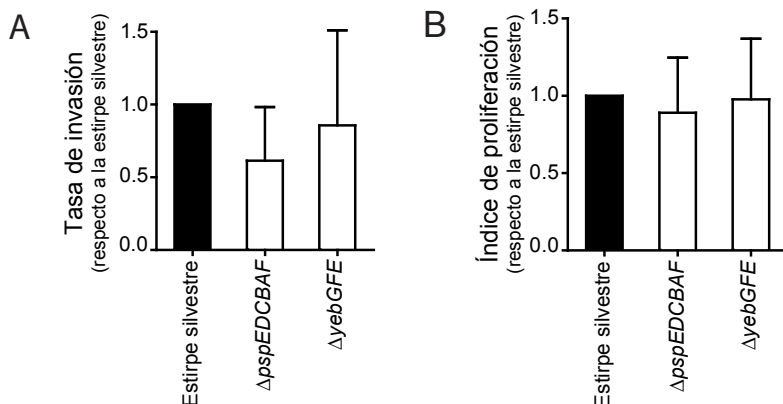


Figura 10. Los mutantes del grupo IV no presentan diferencias significativas en la invasión ni la proliferación de *S. Typhimurium* en fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24 h y 2 h, (B) de la estirpe silvestre (SV5015) y de mutantes de *S. enterica* serovar Typhimurium (indicados en la Tabla 1) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,51 \pm 0,06$ y $0,93 \pm 0,26$, respectivamente.

En general, estos resultados sugieren que las proteínas codificadas por la mayoría de los genes estudiados son dispensables para la adaptación al estado no proliferativo de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos. La ausencia de fenotipo podría ser explicada por la redundancia metabólica y funcional patente en estudios de *S. Typhimurium* en otros modelos de infección (Becker *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 2.

Requerimientos nutricionales de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el ambiente intracelular.

Los estudios de expresión génica global realizados en bacteria intracelular han aportado algunos indicios acerca de los posibles nutrientes que *S. Typhimurium* utiliza durante la infección de células epiteliales y macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003; Hautefort *et al.*, 2008). Sin embargo, no existen datos sobre los requerimientos nutricionales de *S. Typhimurium* en el interior de la SCV de fibroblastos. Los estudios de transcriptómica realizados en nuestro laboratorio sugieren que *S. Typhimurium* podría utilizar fuentes de carbono alternativas al gluconato en el interior de fibroblastos, al contrario de lo observado en macrófagos y células epiteliales (Núñez-Hernández, 2008). Por tanto, consideramos la posibilidad de que *S. Typhimurium* utilizara otros azúcares como fuente de carbono. Tras iniciar una colaboración con el grupo de la Dra. Figueroa-Bossi (Centro Nacional de Investigaciones Científicas “Gif-sur-Yvette”, Francia) nos pareció interesante comprobar si los disacáridos de NAcGlc-NAcGlc, como los captados por las porinas ChiP y ChiQ, pudieran ser una fuente de carbono empleada por *S. Typhimurium* en el interior del fibroblasto.

Además, los estudios de transcriptómica de *S. Typhimurium* realizados tanto en macrófagos y células epiteliales como en fibroblastos han indicado que la SCV es limitante en micronutrientes como hierro, magnesio y manganeso (Hautefort *et al.*, 2008; Núñez-Hernández, 2008). Por eso, nos propusimos estudiar el metabolismo de uno de estos micronutrientes, el hierro, durante la infección de fibroblastos por *S. Typhimurium*.

2.1 Expresión de los transportadores de NAcGlc de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos.

Recientemente se ha descrito que *S. Typhimurium* induce la expresión de los genes *chiP* (*STM0687*) y *chiQ* (*STM0688*) en presencia de oligosacáridos derivados de quitina, como quitobiosa o quitotriosa (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009). Estos genes codifican porinas de membrana externa que captan oligosacáridos de 2 o 3 unidades de NAcGlc. Asimismo, trabajos anteriores han demostrado que la membrana de la SCV es rica en glicoproteínas (García-del Portillo *et al.*, 1993). En mamíferos, las glicoproteínas son procesadas inicialmente mediante incorporación de restos de NAcGlc. Estos hechos nos hicieron cuestionarnos si *S. Typhimurium* pudiera estar expresando ChiP y ChiQ para adquirir disacáridos de NAcGlc-NAcGlc como fuente de carbono durante la infección de fibroblastos.

Para su estudio se emplearon cepas etiquetadas con el epítipo FLAG en los genes *chiP* y *chiQ* en el fondo genético de la estirpe LT2 de *S. Typhimurium* cedidas

por la Dra. Figueroa-Bossi. Los genes etiquetados se pasaron al contexto genético de la estirpe silvestre empleada en este trabajo (SL1344 His+) (**Tabla A2 del Anexo I**).

Los extractos de bacteria obtenidos a partir de estas cepas crecidas en medio LB mostraron una fuerte expresión de la proteína ChiQ (**Fig. 11**). Sin embargo, la proteína ChiP no fue detectada. Aunque los genes *chiP* y *chiQ* están regulados coordinadamente, se ha demostrado que ChiQ parece ser dispensable para el crecimiento en quitobiosa o quitotriosa (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009). Con lo cual el hecho de que ChiQ sea detectada en medio LB podría deberse a que su función no esté tan íntimamente ligada a la captación de estos oligosacáridos.

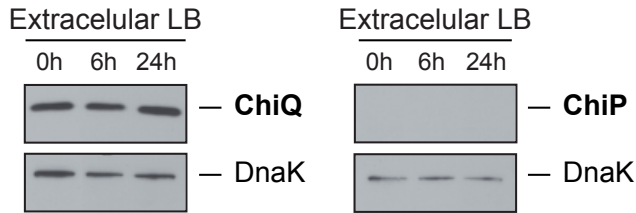


Figura 11. Expresión de la proteína ChiQ de *S. Typhimurium* en medio LB. Detección de las proteínas ChiQ y ChiP en *S. Typhimurium* durante el crecimiento en medio LB. El tiempo 0h representa el tiempo al que se diluyó el cultivo en fase estacionaria en medio nuevo. A las 6 y 24 horas después de diluir el cultivo se realizó la extracción de proteínas de la bacteria. Las muestras corresponden a $\sim 10^8$ bacterias. Las proteínas ChiP ($\sim 53\text{kDa}$) y ChiQ ($\sim 12\text{kDa}$) se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona DnaK ($\sim 70\text{kDa}$).

Los genes *chiP* y *chiQ* están regulados negativamente por un “ARN regulador de pequeño tamaño” (sRNA) denominado ChiX (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009). Para comprobar que la ausencia de expresión de ChiP es consecuencia del efecto de ChiX, se introdujo una delección del gen *chiX* en las cepas con las proteínas ChiP y ChiQ etiquetadas. Las cepas generadas fueron crecidas en LB. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína ChiP se sintetiza en ausencia del gen *chiX*. Además, se observó una mayor cantidad de la proteína ChiQ en ausencia del gen *chiX* en comparación a la estirpe silvestre etiquetada en *chiQ* (**Fig. 12**). La síntesis de la proteína ChiQ en presencia de ChiX se explica por el hecho de que el sRNA ejerce su efecto regulador hibridando con el primer sitio de unión al ribosoma (RBS) del transcrito *chiPQ* que afecta a ChiP, quedando libre el RBS de ChiQ (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009).

No obstante, en los extractos de proteína obtenidos a partir de bacteria intracelular no se detectaron ChiP ni ChiQ (**Fig. 12**). Esto indicaría la ausencia de disacáridos de NAcGlc-NAcGlc en el interior del SCV del fibroblasto.

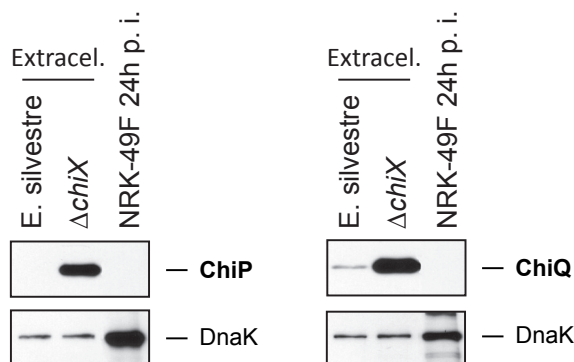


Figura 12. Control de la síntesis de las proteínas ChiP y ChiQ de *S. Typhimurium* por el sRNA ChiX en bacteria extracelular e intracelular. Las cepas *chiP*::3xFLAG-kan, *chiQ*::3xFLAG-kan, *ΔchiX*::*cat chiP*::3xFLAG-kan y *ΔchiX*::*cat chiQ*::3xFLAG-kan se crecieron en medio LB durante 18h para la extracción de proteínas. Los fibroblastos NRK-49F fueron infectados con las cepas *chiP*::3xFLAG-kan y *chiQ*::3xFLAG-kan. Veinticuatro horas después de la infección se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Las muestras corresponden a: $\sim 5 \times 10^7$ células infectadas para las muestras intracelulares y $\sim 10^8$ bacterias para las muestras extracelulares. Las proteínas ChiP (~ 53 kDa) y ChiQ (~ 12 kDa) se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona DnaK (~ 70 kDa).

2.2 Análisis de la captación del hierro por *S. Typhimurium* en el interior de fibroblastos.

Estudios previos de transcriptómica de *S. Typhimurium* en macrófagos y células epiteliales han puesto de manifiesto que la bacteria expresa sistemas de adquisición de hierro durante la infección, como Iro, Sit, Fep y Fhu (Hautefort *et al.*, 2008). Durante la infección de fibroblastos, tanto la estirpe silvestre como el mutante *phoP* de *S. Typhimurium* inducen la expresión de algunos de los genes que codifican estos sistemas (**Fig. 13**) (Núñez-Hernández, 2008).

2.2.1 Efecto de la suplementación de hierro sobre el estado no proliferativo de *S. Typhimurium* en fibroblastos.

Teniendo en cuenta la baja tasa de crecimiento característica de *S. Typhimurium* en fibroblastos, quisimos comprobar si este estado no proliferativo variaba en función de la cantidad de hierro disponible en el medio. Para ello diseñamos un ex-

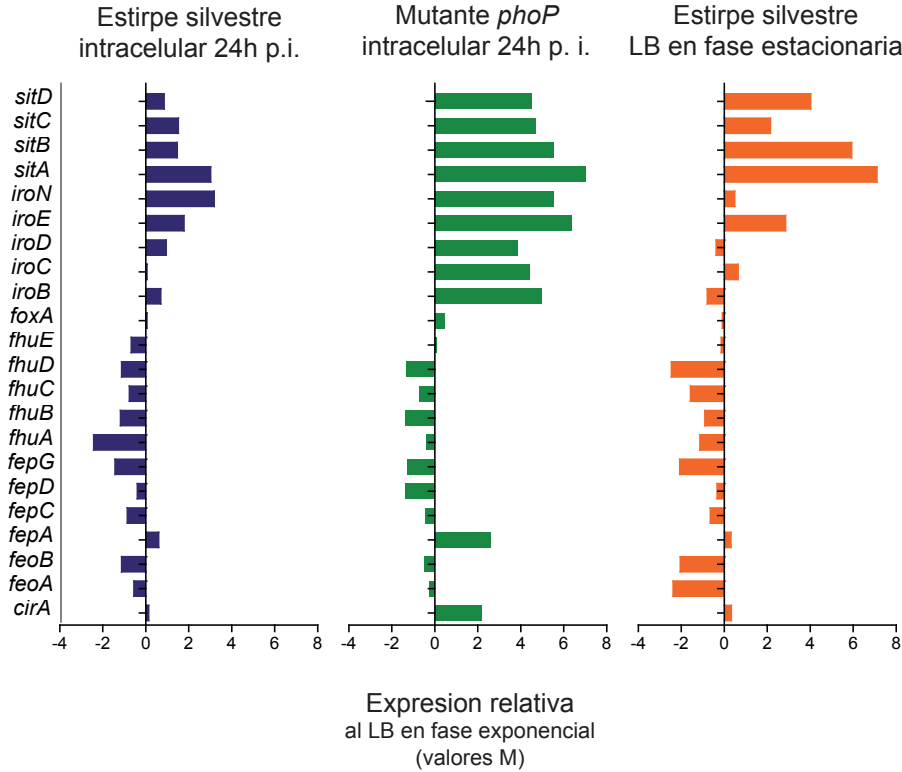


Figura 13. Expresión de los genes relacionados con el transporte de hierro en la estirpe silvestre y en el mutante *phoP* de *S. Typhimurium*. Se muestran los valores de expresión (M) de cada condición experimental referidos a la fase exponencial de crecimiento en medio LB (Fig. 2). Datos obtenidos a partir del transcriptoma descrito en la Tesis Doctoral de la Dra. Núñez Hernández (Núñez-Hernandez, 2008).

perimento de infección con cuatro variables combinadas entre sí: bacteria crecida en medio LB convencional, bacteria crecida en LB suplementado con una fuente de hierro (60 μM FeCl_3), células eucariotas crecidas en medio convencional y células eucariotas crecidas en medio suplementado con una fuente de hierro (60 μM FeCl_3). El experimento fue realizado tanto en fibroblastos NRK-49F como en células epiteliales HeLa. En este último modelo de infección *S. Typhimurium* presenta una tasa de crecimiento unas 7 o 10 veces superior al modelo de fibroblastos (Martínez-Moya *et al.*, 1998).

Los datos mostraron una mayor proliferación de la bacteria cuando el medio de cultivo de las células eucariotas presentaba una mayor concentración de hierro, independientemente de que la bacteria hubiese crecido en medio suplementado con

hierro o no. Este efecto, que supuso un incremento de 5 a 7 veces del número de bacteria intracelular, se observó solo en fibroblastos (**Fig. 14A**) y no en células epiteliales HeLa (**Fig. 14B**).

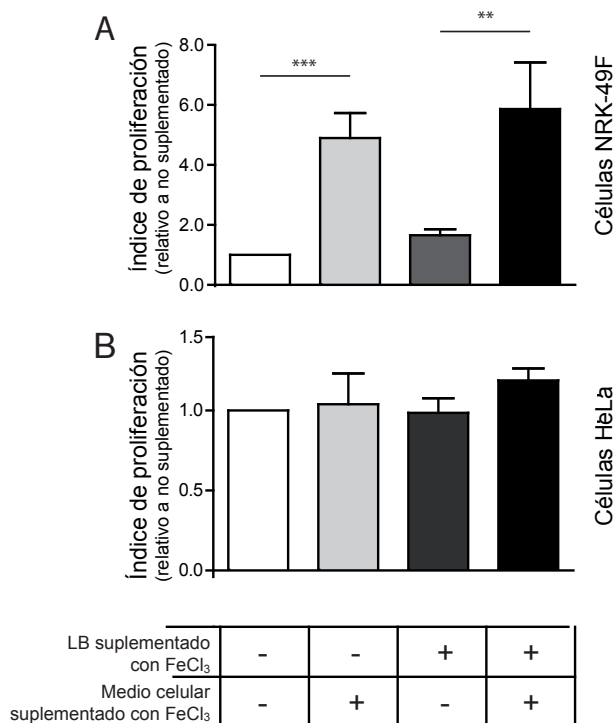
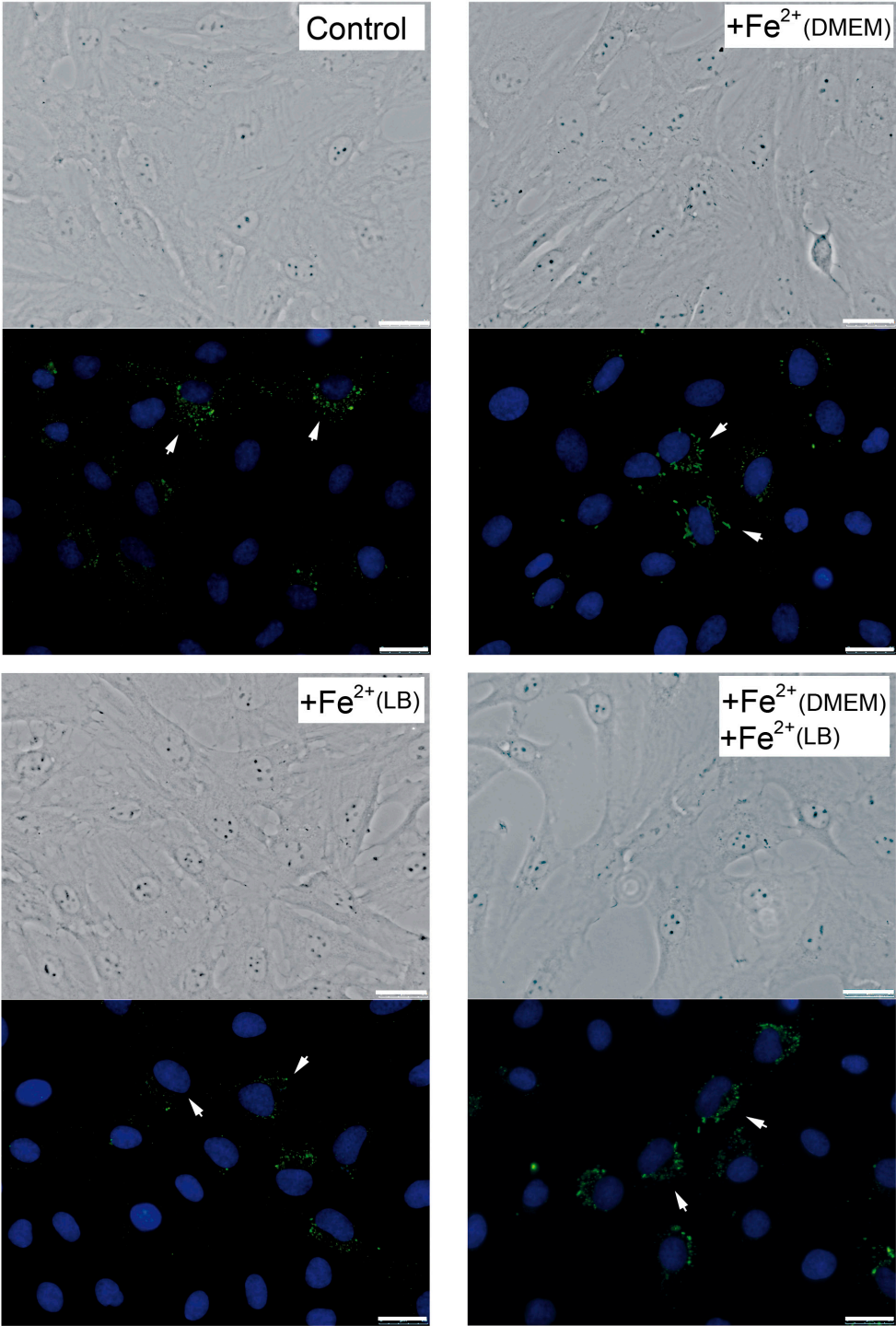


Figura 14. La tasa de proliferación intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos aumenta al añadir hierro al medio de celular. Índice de proliferación, medido como cociente de bacterias intracelulares entre 24h y 2h, en fibroblastos NRK-49F (A) y células epiteliales HeLa (B) de la estirpe silvestre SV5015 de *S. Typhimurium*. Los valores mostrados corresponden a la media y error estándar relativos a la infección sin adición de hierro de cuatro experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett ($p < 0,05$). Índice de proliferación de la estirpe silvestre en los cultivos no tratados en valores absolutos en NRK-49F: $0,53 \pm 0,15$; en HeLa: $7,5 \pm 0,72$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Los datos anteriores concuerdan con las observaciones microscópicas de fibroblastos NRK-49F infectados con la estirpe silvestre SV5015 bajo las diferentes condiciones descritas, las cuales revelaron un mayor número de bacteria intracelular siempre en el caso en los que el medio de fibroblastos era suplementado con hierro (**Fig. 15A**). No obstante, la proporción de fibroblastos infectados no se vio alterada, lo cual indica un aumento en la tasa de crecimiento intracelular. Por otro lado, en las observaciones realizadas en células HeLa no se apreciaron cambios aparentes en cuanto al número de bacteria intracelular en ninguna de las condiciones ya descritas (**Fig. 15B**).

A Células NRK-49F



B Células HeLa

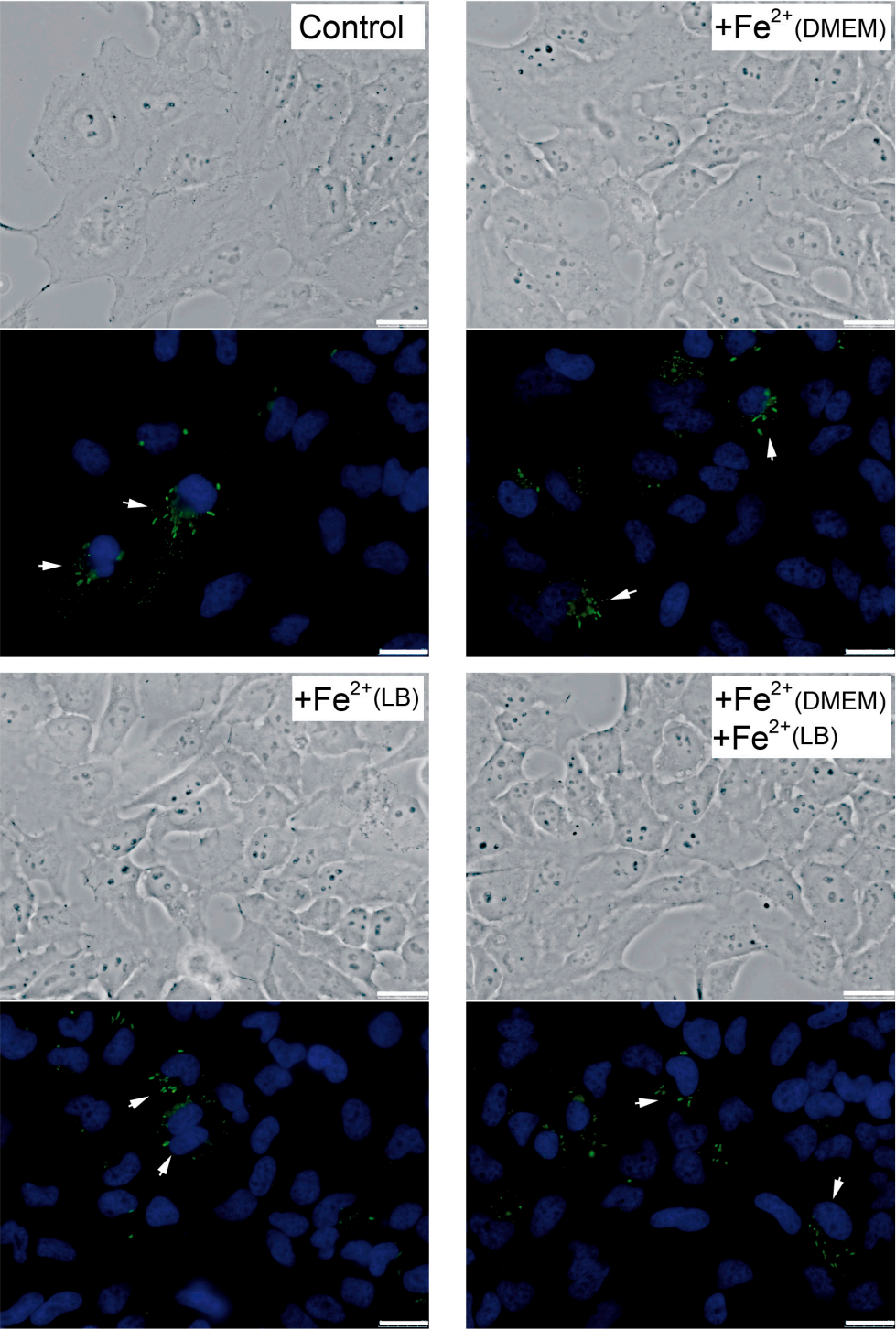


Figura 15. La suplementación del medio de células eucariotas con hierro aumenta el número de bacteria intracelular en fibroblastos pero no en células epiteliales. Análisis microscópico de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos NRK-49F (A) y de células epiteliales HeLa (B). Las células fueron infectadas con la estirpe silvestre SV5015 bajo diferentes combinaciones de suplementación de hierro al medio de células eucariotas (DMEM o MEM) o de bacteriano (LB) y sin suplementación (control). Tras 24h de infección se detectó la bacteria intracelular empleando anticuerpo policlonal anti-LPS (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Las flechas indican células infectadas. Las barras de escala corresponden a 25µm.

En su conjunto, estos resultados demostraron que la tasa de crecimiento intracelular de *S. Typhimurium* es dependiente, en cierta medida, de la concentración de hierro presente en la SCV del fibroblasto.

2.2.2 Estudio de los transportadores de hierro de *S. Typhimurium* en infección de fibroblastos NRK-49F y células epiteliales HeLa.

Los diferentes transportadores de hierro que expresa *S. Typhimurium* configuran tres vías principales de captación de hierro. Estas son: a) vía de captación de catecolatos o sideróforos endógenos, compuesto por los transportadores FepA, IroN, CirA, FepCGD; b) vía de captación de hidroxamatos o sideróforos exógenos, compuesto por FhuA FhuE, FhuBC y FoxA; y c) vía de captación de hierro no acomplejado o ion ferroso, compuesto por FeoABC y SitABCD (**Fig. 16**) (Drago-Serrano, 2009).

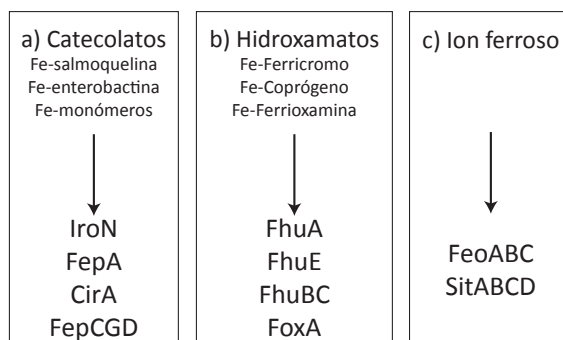


Figura 16. Esquema de los sistemas de adquisición de hierro descritos en *S. Typhimurium*. a) vía de catecolatos, en la que intervienen los transportadores FepA, IroN, CirA y FepCGD; b) vía de hidroxamatos, de la que forman parte los transportadores FhuA, FhuE, FhuBC y FoxA; c) vía independiente de sideróforo, compuesta por los transportadores de membrana interna FeoABC y SitABCD.

Diversos estudios han comprobado que la carencia de transportadores de hierro afecta a la virulencia de *S. Typhimurium* en diferentes modelos de infección, como en el caso de mutantes en *iroBCDEN*, *fepA*, *cirA* (Crouch *et al.*, 2008; Fischbach *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2006; Rabsch *et al.*, 2003), *fepCGD* (Bearson *et al.*, 2008), *feoABC* (Cartron *et al.*, 2006) y *sitABCD* (Janakiraman y Slauch, 2000). Asimismo, tal y como muestran nuestros resultados (capítulo 2.2.1), la concentración de hierro influye sobre la tasa de crecimiento de *S. Typhimurium* en el ambiente intracelular de fibroblastos. Dados estos antecedentes, quisimos comprobar qué papel juegan los diferentes transportadores de hierro durante el proceso infeccioso de *S. Typhimurium* en fibroblastos.

Partiendo de los genes involucrados en la adquisición de hierro, generamos cepas mutantes carentes de estos genes (**Tabla A3 del anexo I**). Los primeros ensayos pusieron de manifiesto cambios fenotípicos ya en el medio LB. Las cepas carentes del transportador de membrana interna FepCGD y los tres transportadores de membrana externa IroN, FepA y CirA presentaron un fenotipo idéntico (**Fig. 17**). Este fenotipo se caracterizó por una disminución de la velocidad de crecimiento de los mutantes $\Delta fepCGD$ y $\Delta iroBCDEN \Delta fepA \Delta cirA$ en LB-agar. Al suplementar el medio con hierro ($60 \mu\text{M FeCl}_3$), ambos mutantes presentaron una velocidad de crecimiento similar a la estirpe silvestre. Por el contrario, la adición de *ácido dietilén-triamino-pentaacético* ($50 \mu\text{M DTPA}$) como quelante de iones metálicos, afectó aún más a la velocidad de crecimiento de los mutantes $\Delta fepCGD$ y $\Delta iroBCDEN \Delta fepA \Delta cirA$ (**Fig. 17**).

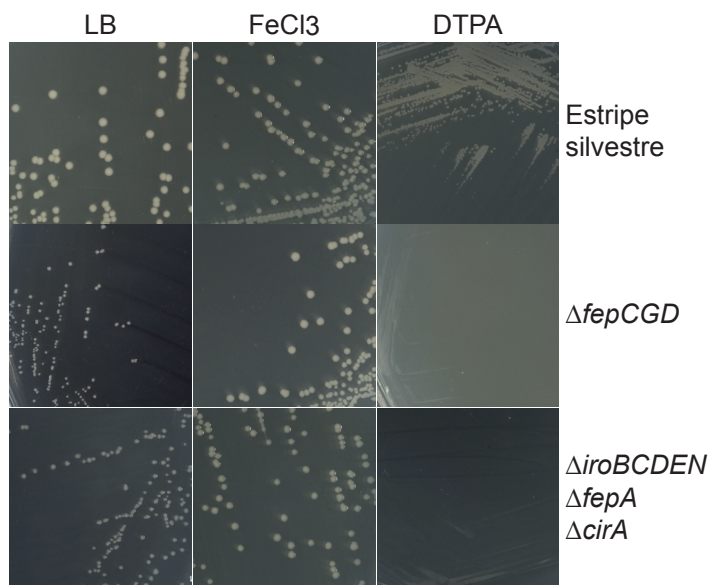


Figura 17. La carencia de los transportadores FepCGD, FepA, IroN y CirA retrasa el crecimiento de *S. Typhimurium* en placa. Colonias de la estirpe silvestre SV5015 y los mutantes $\Delta fepCGD$ y $\Delta iroBCDEN \Delta fepA \Delta cirA$ de *S. Typhimurium* en medio LB-agar, medio LB-agar suplementado con FeCl_3 ($60 \mu\text{M}$) y medio LB-agar con DTPA ($50 \mu\text{M}$). Incubadas en paralelo a 37°C durante 16h.

Estos resultados sugieren que el medio LB esta compuesto principalmente por hierro acomplejado. Debido a ello, la bacteria no puede crecer correctamente si carece de los sistemas de captación de catecolatos como Iro, Fep y Cir. El hecho de que la adición de sales de hierro restaure el fenotipo silvestre indicaría que los mutantes

podrían emplear otro tipo de transportadores, como los de ion ferroso Sit y Feo.

Dada la aparente redundancia funcional de estos transportadores generamos mutantes múltiples carentes de varios transportadores (**Tabla A3 del anexo I**) (**Fig. 16**). En algunos de estos mutantes, como $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ también observamos un retraso del crecimiento en LB-agar en comparación a la estirpe silvestre (**Fig. 18C y D**). Este fenotipo fue incluso más acusado en el caso del mutante carente de Sit, Feo, Fep y Fhu. Sin embargo, no presentó este fenotipo el mutante doble $\Delta sitABCD \Delta feoABC$ (**Fig. 18B**), cuya velocidad de crecimiento fue similar a la de la estirpe silvestre (SV5015) (**Fig. 18A**). Por tanto, la deficiencia en el transportador FepCGD parece provocar a un retardo en la velocidad de crecimiento de *S. Typhimurium* en LB-agar. Estos resultados también ponen de manifiesto la importancia de los transportadores de catecolatos para el crecimiento de la bacteria en medio LB-agar.

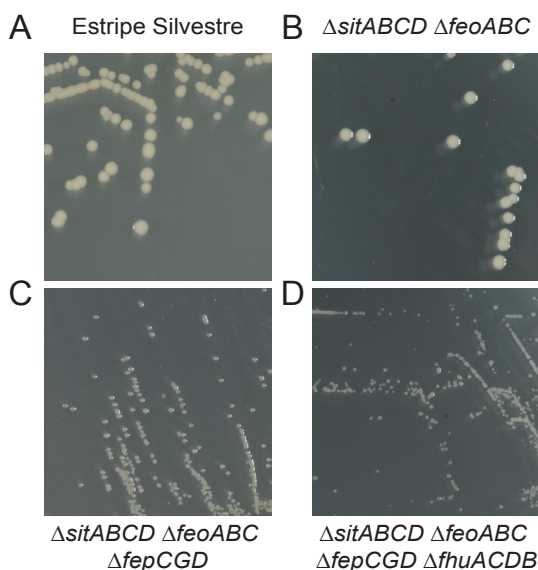


Figura 18. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB provoca un retraso del crecimiento de *S. Typhimurium* en placa. Colonias de la estirpe silvestre SV5015 (A) y los mutantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$ (B), $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ (C) y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ (D) de *S. Typhimurium* en medio LB agar. Incubadas en paralelo a 37°C durante 16h.

Con el fin comprobar si el retardo en el crecimiento observado en los mutantes carentes del transportador FepCGD observado en placa ocurría igualmente en LB líquido, se realizaron curvas de crecimiento. Este experimento mostró que las cepas

con mutaciones triples $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y cuádruples $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ crecieron con mayor tiempo de generación que la estirpe silvestre. Sin embargo, el crecimiento del mutante doble $\Delta sitABCD \Delta feoABC$ no se vio afectado. No obstante, todos los mutantes alcanzaron los mismos niveles de densidad óptica que la estirpe silvestre a 24h (**Fig. 19**). Estos datos nos permitieron concluir que la carencia del transportador FepCGD provoca una disminución en la velocidad de crecimiento de *S. Typhimurium* tanto en medio LB sólido como líquido.

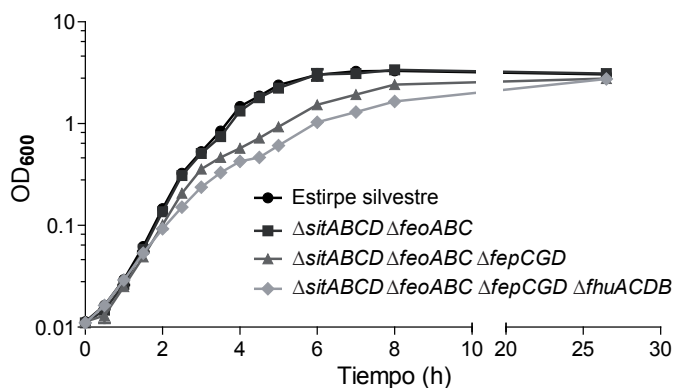


Figura 19. La velocidad de crecimiento de *S. Typhimurium* en medio LB líquido se ve afectada por la carencia del transportador FepCGD. Curva de crecimiento de estirpe silvestre SV5015 y los mutantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ de *S. Typhimurium* en medio LB líquido. Todas las cepas fueron diluidas a una DO_{600} inicial de 0,01 en un volumen final de 50 mL de medio. Incubadas en paralelo a 37°C durante 24h. Las medidas se realizaron a la vez para todas las cepas.

Todos los mutantes carentes de uno o varios transportadores de hierro fueron ensayados en fibroblastos NRK-49F para determinar el papel que juegan durante la infección. En estos ensayos analizamos la capacidad invasiva y la proliferación intracelular de estos mutantes con respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 20 y 21**). El mutante $\Delta foxA$, carente del transportador de membrana externa de ferrioxamina, un tipo de hidroxamatos (**Fig. 1 y 16**), mostró un aumento en el índice de proliferación dos veces superior respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 20B**). No obstante, este mismo mutante no presentó cambios en la tasa de invasión (**Fig. 20A**).

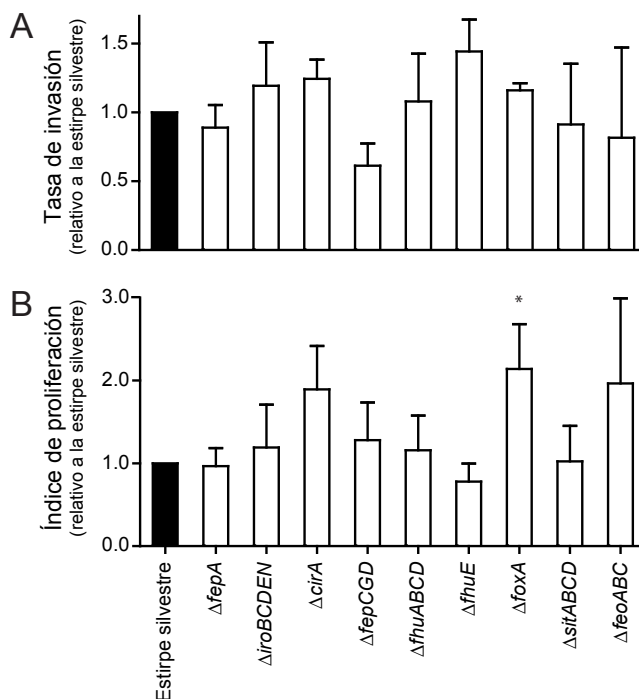


Figura 20. La carencia de un único transportador de hierro no afecta a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos NRK-49F. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24 h y 2 h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes deficientes en un solo transportador de hierro de *S. Typhimurium* (Tabla A3 del anexo I) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,31 \pm 0,17$ y $0,95 \pm 0,51$, respectivamente. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). * $p < 0,05$.

En el caso de los mutantes carentes de varios transportadores de hierro, como Sit, Feo y Fep, se observaron diferencias significativas muy drásticas (**Fig. 21**). La cepa con la mutación doble $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, cuyo fenotipo en LB no variaba con respecto a la estirpe silvestre (**Fig. 18B y 19**), presentó un índice de proliferación cinco veces inferior al de la estirpe silvestre (**Fig. 21B**). Estas diferencias eran debidas exclusivamente a una deficiencia en la supervivencia intracelular, ya que la capacidad invasiva del mutante apenas se vio alterada (80% respecto de la estirpe silvestre) (**Fig. 21A**). Los cambios fueron aún más drásticos en el caso del mutante triple $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$, que presentó una tasa de invasión un 70% inferior a la estirpe silvestre (**Fig. 21A**). Notablemente, la tasa de crecimiento intracelular medida para este mutante fue ~50 veces inferior a la cepa parental silvestre (**Fig. 21B**).

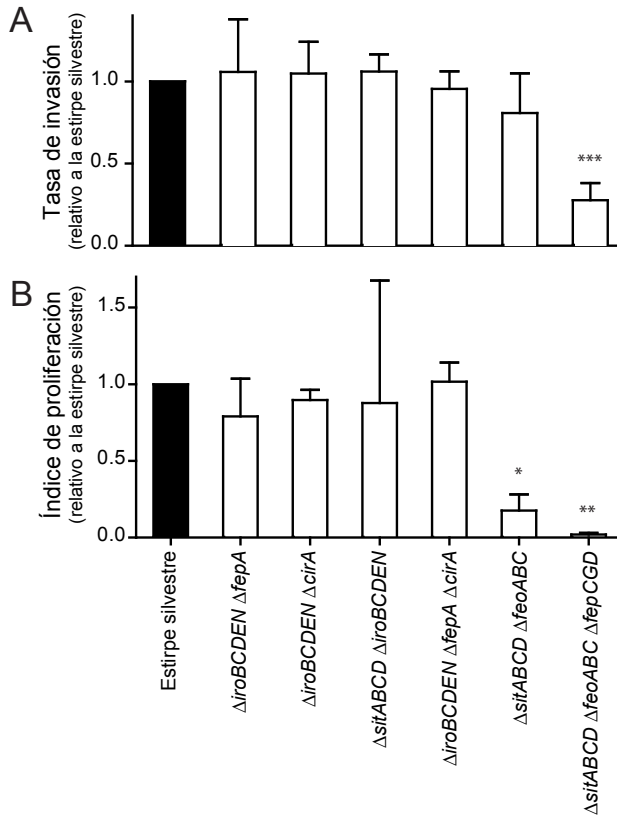


Figura 21. La supervivencia intracelular de los mutantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ de *S. Typhimurium* se ve afectada en fibroblastos. Tasa de invasión, medida a las 2h de infección, (A) e índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24h y 2h, (B) de la estirpe silvestre SV5015 y de mutantes deficientes en varios transportadores de hierro de *S. Typhimurium* (Tabla A3 del anexo I) en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y desviación estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Media y desviación estándar de la tasa de invasión e índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: $0,74 \pm 0,26$ y $0,97 \pm 0,24$, respectivamente. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Al microscopio se observó un menor número de fibroblastos infectados, sobre todo en el mutante triple $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$, y un número de bacteria intracelular muy reducido en comparación con la estirpe silvestre. En el caso de la cepa $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, el descenso en el número de bacteria intracelular no era tan apreciable (Fig. 22).

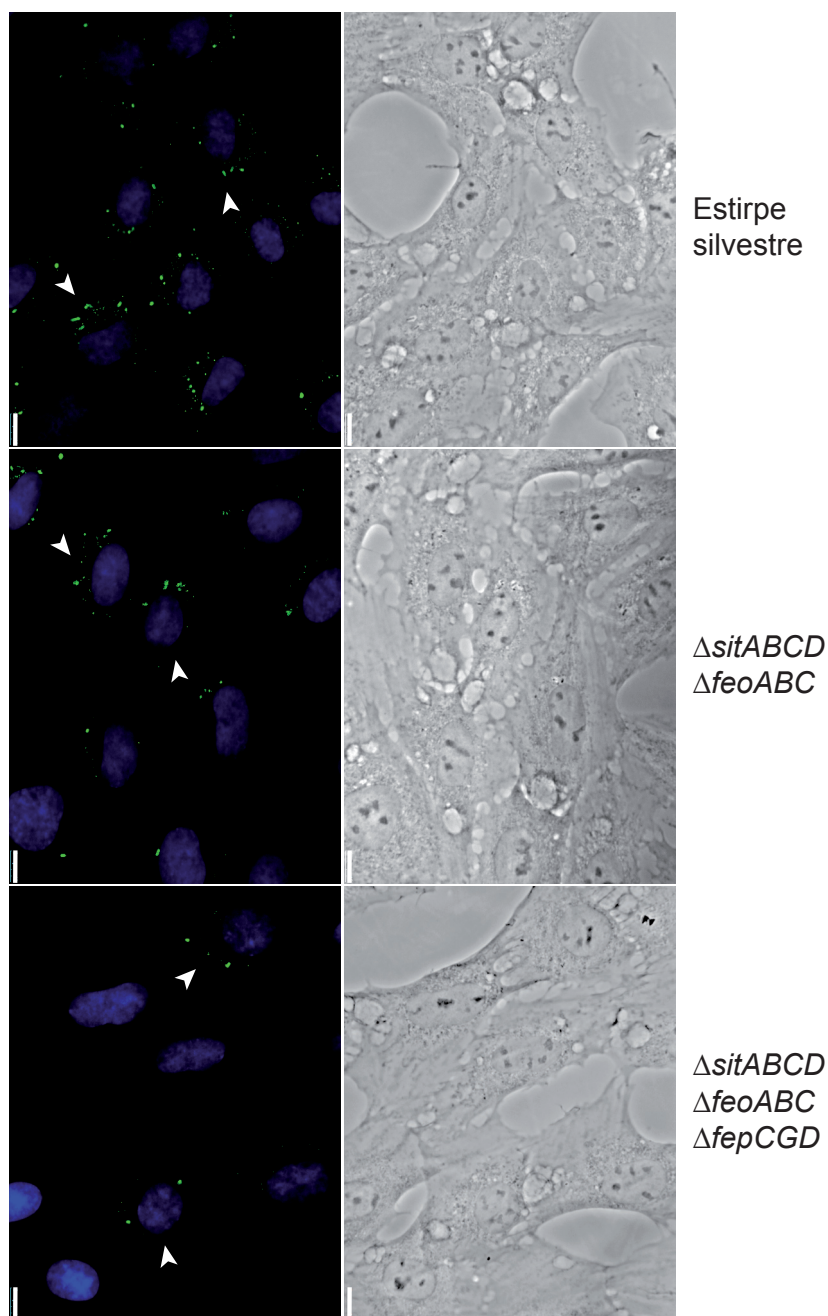


Figura 22. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC y FepCGD provoca una disminución en el número de bacterias intracelulares en fibroblastos. Análisis microscópico de los mutantes $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ y $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ $\Delta fepCGD$ de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos NRK-49F. Las células fueron infectadas con la estirpe silvestre SV5015 o con las cepas mutantes. Tras 24h de infección se detectó la bacteria con un anticuerpo policlonal anti-LPS (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Las flechas indican células infectadas. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

Esta disminución de la supervivencia intracelular del mutante carente de los transportadores Sit y Feo sugiere que, durante la infección de fibroblastos, *S. Typhimurium* se encuentra en un ambiente con escasa disponibilidad de hierro, cuya forma predominante podría ser el ion ferroso no acomplexado. Este hecho demuestra la importancia que tienen este tipo de transportadores durante el proceso infeccioso en fibroblastos. Sin embargo, la deficiencia tan drástica que sufre el mutante $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$, que carece además del transportador de catecolatos FepCGD, demuestra que también existe una proporción de hierro acomplexado en el interior del fibroblasto que *S. Typhimurium* es capaz de aprovechar eficientemente.

Teniendo en cuenta estos resultados y las diferencias observadas entre los fibroblastos NRK-49F y las células epiteliales HeLa en cuanto al metabolismo del hierro (**Fig. 14 y 15**), nos preguntamos si también existirían diferencias en los transportadores empleados por *S. Typhimurium* en los dos tipos celulares. Los resultados obtenidos en los ensayos de infección con células HeLa no mostraron cambios significativos en la invasión y proliferación intracelular de los mutantes carentes de los transportadores Sit, Feo, Fep y Fhu (**Fig. 23**).

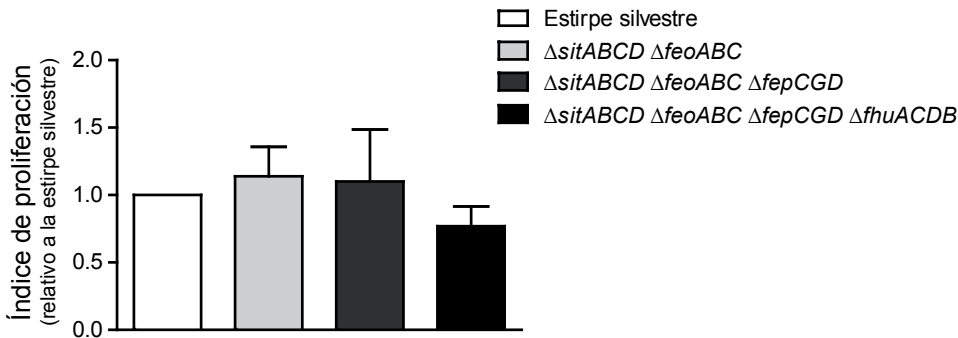


Figura 23. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB no afecta a la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en células epiteliales HeLa. Índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24h y 2h, de la estirpe silvestre SV5015 y de los mutantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ de *S. Typhimurium* en células epiteliales HeLa. Los valores mostrados corresponden a la media y error estándar relativos a la estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias de los mutantes con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). Media del índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos: 7,47. ns: no significativo.

Asimismo, en las observaciones al microscopio de células HeLa infectadas con estos mutantes no se observaron cambios tan drásticos como los observados en fibroblastos (**Fig. 24**).

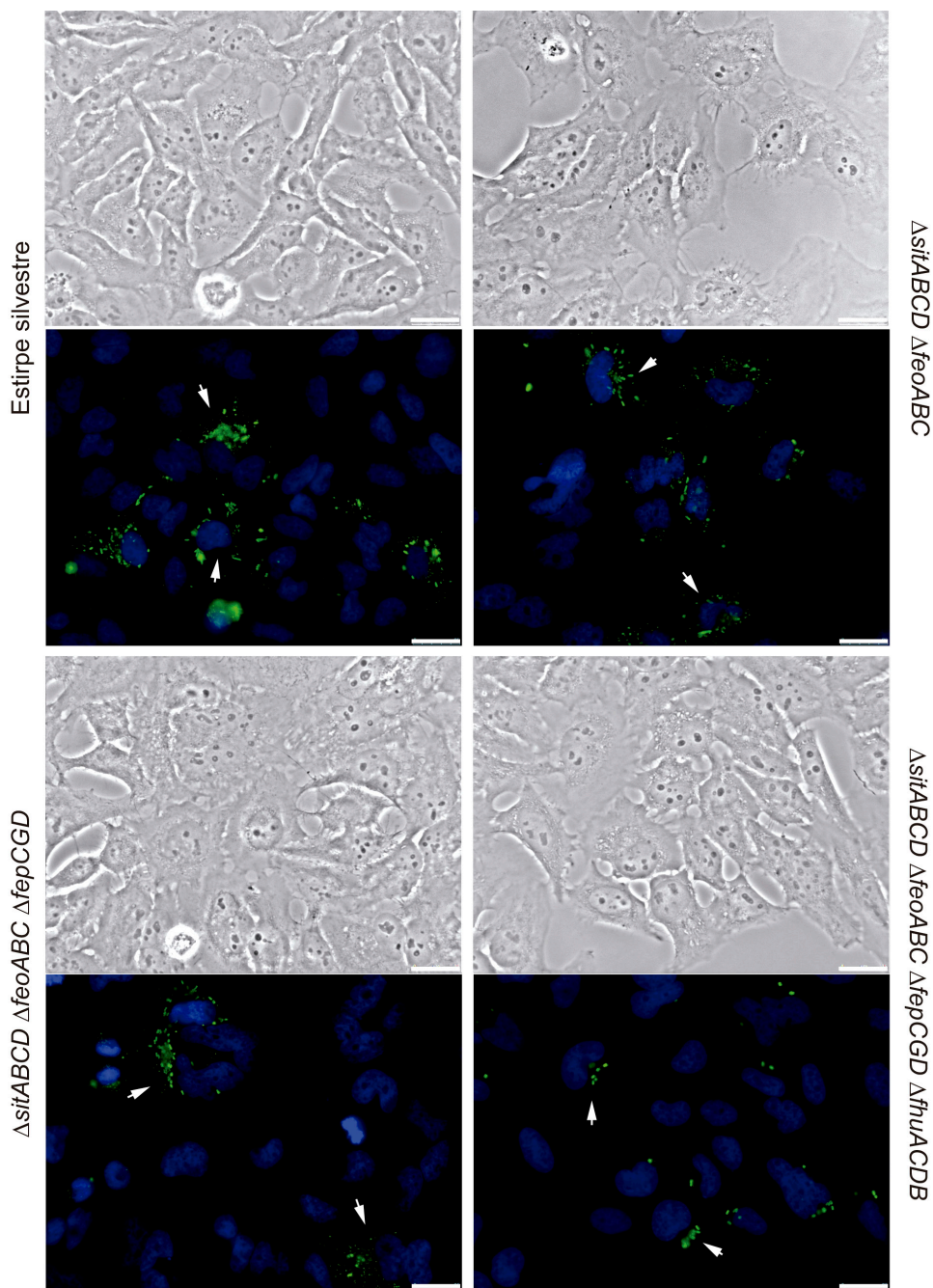


Figura 24. La carencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB altera mínimamente el número de bacterias intracelulares en células epiteliales HeLa. Análisis microscopico de los muntantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ de *S. Typhimurium* durante la infección en células epiteliales HeLa. Las células fueron infectadas con la estirpe silvestre SV5015 o con las cepas mutantes. Tras 24h de infección detectó la bacteria con un anticuerpo policlonal anti-LPS (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Las flechas indican células infectadas. Las barras de escala corresponden a 25 μ m.

Por otro lado, quisimos comprobar si la disminución de la supervivencia intracelular de los mutantes en los sistemas Sit, Feo y Fep era debida enteramente a la carencia de hierro. Para ello realizamos curvas de crecimiento con los mutantes $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$, $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ $\Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD$ $\Delta feoABC$ $\Delta fepCGD$ $\Delta fhuACDB$ en medio LB, al cual se adicionó DTPA como quelante. A partir de aquí se tomaron muestras para, mediante recuento de colonia en placa, comprobar si la viabilidad de las bacterias se veía afectada a lo largo del tiempo debido a la ausencia de hierro. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en cuanto al número de bacterias viables obtenidas durante el crecimiento en presencia o en ausencia de DTPA para ninguno de los mutantes probados (**Fig. 25**).

La disminución de la viabilidad observada para los mutantes doble y triple en los sistemas Sit, Feo y Fep en el interior de fibroblastos (**Fig. 21 y 22**) admite dos interpretaciones. Por un lado, que el ambiente intravacuolar del fibroblasto sea un medio más restrictivo para la adquisición de hierro que el medio LB con DTPA. Por otro lado, se podría considerar un efecto aditivo de la carencia de varios tipos de nutrientes, incluyendo el del hierro, junto a la acción de mecanismos de defensa del hospedador (García-del Portillo 2001; Eriksson et al. 2003; Thompson et al. 2006; Haraga et al. 2008).

2.2.3 Estudio de la síntesis de transportadores de hierro de *S. Typhimurium* en infección de fibroblastos NRK-49F y células epiteliales HeLa.

De los mutantes generados carentes de los genes involucrados en el transporte de hierro que fueron analizados, sólo algunos presentaron diferencias significativas con respecto a la estirpe silvestre en cuanto a la invasión y proliferación intracelular (**Fig. 20 y 21**). Esto puede ser indicativo de la redundancia funcional en estos transportadores que ya ha sido descrita en otros organismos (Redford *et al.*, 2003). Por otro lado, tampoco podría descartarse que ciertos transportadores no estén siendo producidos por la bacteria intracelular y que, por tanto, su eliminación por procedimientos genéticos no resulte en ningún fenotipo. Por eso, nos propusimos estudiar, a nivel de proteína, la cantidad de transportador producido por la bacteria intracelular.

Teniendo en cuenta las tres vías principales de captación de hierro empleadas por *S. Typhimurium*, (**Fig. 1 y 16**), generamos estirpes etiquetadas en cinco de las proteínas: tres pertenecientes a la vía de catecolatos (IroN, FepA, CirA) y otras dos pertenecientes a la vía del transporte del ion ferroso (SitD y FeoB) (**Tabla A3 del anexo I**). No se etiquetaron los transportadores de la vía de los hidroximatos (FhuA, FhuBC, FhuE

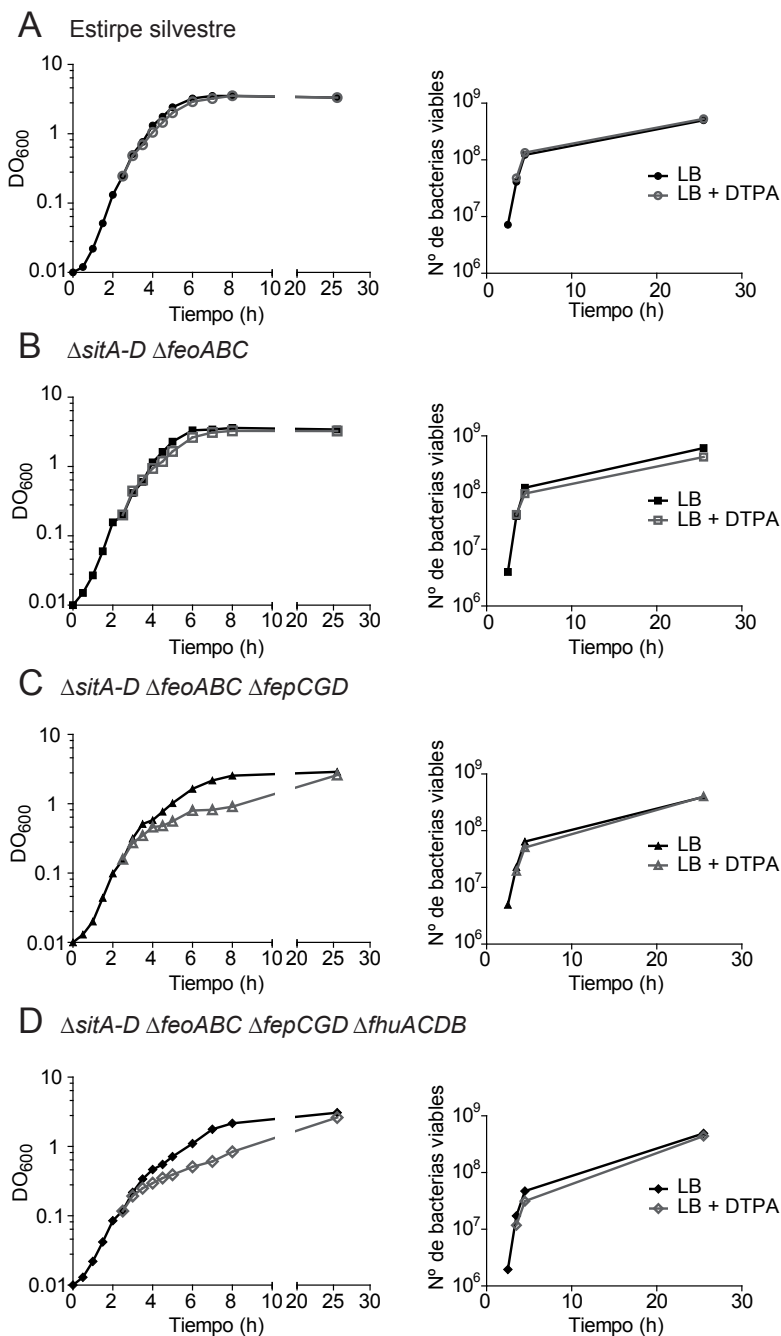


Figura 25. La ausencia de los transportadores SitABCD, FeoABC, FepCGD y FhuACDB no afecta a la viabilidad de *S. Typhimurium* en medio LB carente de hierro. Curva de crecimiento y número de bacterias viables de la estirpe silvestre (SV5015) y las cepas mutantes $\Delta sitABCD \Delta feoABC$, $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$ y $\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB$ de *S. Typhimurium* en LB o en LB con DTPA. Cuando los cultivos llegaron hasta una densidad óptica de 0,2 se dividieron y a la mitad se añadió 50 μ M de DTPA. Se tomaron muestras a cuatro tiempos diferentes para hacer el recuento de bacterias viables. Los valores representados corresponden a un sólo experimento representativo de un total de tres repeticiones independientes realizadas.

y FoxA) al ser una vía dependiente de la producción de sideróforos por otros microorganismos (Kingsley *et al.*, 1999; Ratledge y Dover, 2000; Andrews *et al.*, 2003; Drago-Serrano, 2009).

Tras infectar fibroblastos NRK-49F con las cepas etiquetadas, se hizo una extracción de proteína total de la bacteria intracelular a diferentes tiempos post-infección (4, 8 y 24 horas). Como controles empleamos la bacteria usada como inóculo crecida en medio LB a 37°C sin agitación durante 18h, y la bacteria crecida bajo condiciones de inducción que varían según la proteína. Así, la inducción de IroN, FepA, CirA se hizo en medio LB con DTPA (50 μ M) a 37°C durante 18h en agitación (Crouch *et al.*, 2008), la de SitD en medio LB a 37°C en agitación (Ikeda *et al.*, 2005), y la de FeoB se creció en medio ISM-glicerol en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18h (Cartron *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos mostraron que todas las proteínas que fueron etiquetadas, IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD fueron sintetizadas por *S. Typhimurium*

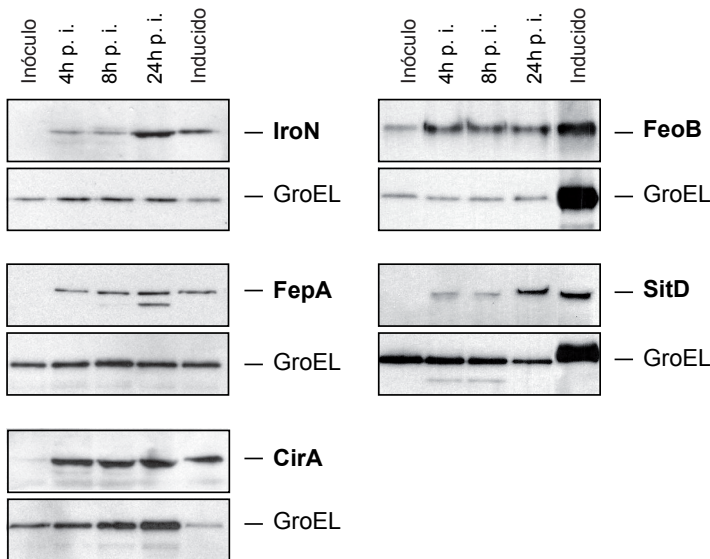


Figura 26. Niveles de las proteínas IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD de *S. Typhimurium* intracelular en fibroblastos NRK-49F. Los fibroblastos NRK-49F se infectaron con las cepas *iroN::3xFLAG-kan*, *fepA::3xFLAG-kan*, *cirA::3xFLAG-kan*, *feoB::3xFLAG-kan* y *sitD::3xFLAG-kan*. A los tiempos de infección indicados se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos del inóculo (bacterias cultivadas en medio LB sin agitación) y extractos de bacterias crecidas bajo diferentes condiciones de inducción (IroN, FepA y CirA en medio LB con 50 μ M DTPA en agitación, SitD en medio LB en agitación y FeoB en medio ISM-glicerol en anaerobiosis sin agitación). Las muestras corresponden a: $\sim 5 \times 10^7$ células infectadas para las intracelulares y $\sim 10^8$ bacterias para inóculo y cultivo inducido. Las proteínas IroN (~ 78 kDa), FepA (~ 83 kDa), CirA (~ 74 kDa), FeoB (~ 84 kDa), SitD (~ 30 kDa) se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona citoplásmica GroEL (~ 60 kDa).

murium en el interior del fibroblasto (**Fig. 26**). Además, en el caso de IroN y SitD, se apreció un aumento de la cantidad de proteína a 24 horas p. i. con respecto al inóculo y a los puntos de 4 y 8 horas p. i. (**Fig. 26**). Este aumento indicaría una marcada inducción de los sistemas IroN y SitD en el ambiente intracelular, lo cual validaría los datos de transcriptómica obtenidos (**Fig. 13**) (Núñez-Hernández, 2008).

Dadas las diferencias observadas entre el modelo de infección de células epiteliales y el de fibroblastos (**Fig. 14, 23 y 21**), quisimos comprobar los niveles de producción de IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD de *S. Typhimurium* durante la infección de células HeLa. El procedimiento de obtención de muestras fue similar al empleado para los fibroblastos, pero en esta ocasión éstas sólo fueron analizadas a las 8 horas p. i., considerando el patrón de proliferación intracelular de la bacteria en este modelo. Los resultados obtenidos mostraron un patrón de síntesis similar a fibroblastos en lo que refiere a las proteínas IroN, FepA, CirA y FeoB. Sin embargo, la proteína SitD no fue detectada durante la infección de HeLa (**Fig.27**).

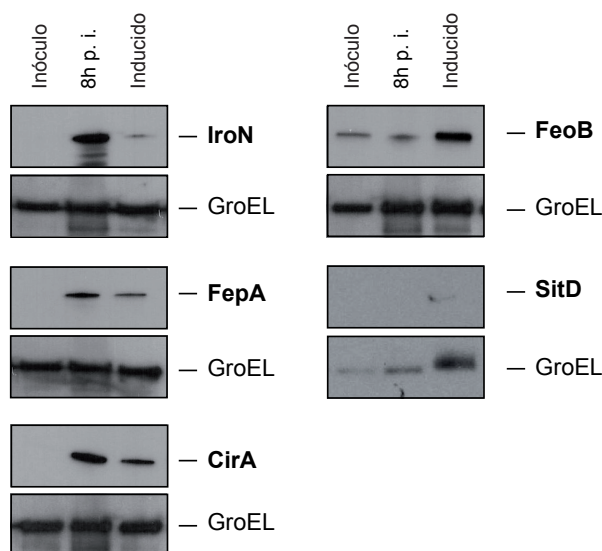


Figura 27. Niveles de las proteínas IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD de *S. Typhimurium* intracelular en células epiteliales HeLa. Células epiteliales HeLa infectadas con las cepas *iroN::3xFLAG-kan*, *fepA::3xFLAG-kan*, *cirA::3xFLAG-kan*, *feoB::3xFLAG-kan* y *sitD::3xFLAG-kan*. Ocho horas después de la infección se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos del inóculo (bacterias cultivadas en medio LB sin agitación) y extractos de bacterias crecidas bajo diferentes condiciones de inducción (IroN, FepA y CirA en medio LB con 50 μ M DTPA en agitación, SitD en medio LB en agitación y FeoB en medio ISM-glicerol en anaerobiosis sin agitación). Las muestras corresponden a: $\sim 2,5 \times 10^7$ células infectadas para las intracelulares y $\sim 10^8$ bacterias para inóculo y cultivo inducido. Las proteínas IroN (~ 78 kDa), FepA (~ 83 kDa), CirA (~ 74 kDa), FeoB (~ 84 kDa), SitD (~ 30 kDa) se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona citoplásmica GroEL (~ 60 kDa).

La síntesis de los transportadores IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD por *S. Typhimurium* demuestra la importancia de la adquisición de hierro durante la infección tanto en fibroblastos como en células epiteliales. Esto requeriría la pérdida de represión de los promotores de los genes que los codifican por parte de la proteína Fur. En un ambiente rico en hierro, la proteína Fur se acompleja con el ion ferroso y forma dímeros que se unen al promotor de genes relacionados con la captación de hierro, como *iroN*, *fepA*, *cirA*, *sitD* y *feoB*, de modo que bloquea su transcripción (Bagg y Neilands, 1987; Tsolis *et al.*, 1995; Rabsch *et al.*, 2003; Cartron *et al.*, 2006). En ausencia de hierro, la proteína Fur no es capaz de unirse a estos promotores, quedando libres para la transcripción de estos genes.

Etiquetamos la proteína Fur con el fin de comprobar si *S. Typhimurium* sintetizaba este regulador durante la infección de fibroblastos. Para comprobar que el epítipo FLAG no afectaba a la función de Fur, etiquetamos simultáneamente las proteínas FepA y Fur y comprobamos su expresión en medio LB o medio LB con 50 μ M de DTPA. Los resultados mostraron que ambas proteínas, Fur y FepA, son sintetizadas en condiciones de baja concentración de hierro, mientras que FepA no fue detectada en condiciones de abundancia de hierro (**Fig. 28A**). Esto indicaría que la proteína Fur-3xFLAG ejerce su función represora correctamente.

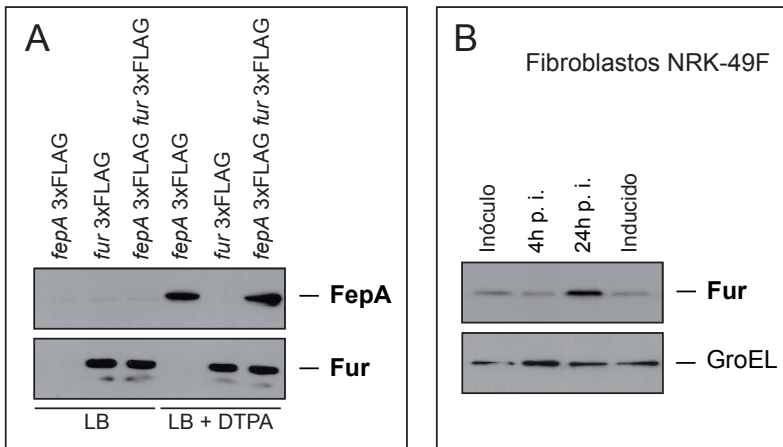


Figura 28. Niveles de las proteínas etiquetadas FepA y Fur de *S. Typhimurium* en presencia o ausencia de hierro. (A) Extractos de proteína total de bacteria crecida en LB o LB con 50 μ M de DTPA en agitación. (B) Extracto de proteína total de bacteria intracelular de la cepa *fur::3xFLAG-kan* en fibroblasto NRK-49F obtenidos a 4 y 24 horas p. i. Como control se muestran extractos de bacterias cultivadas en medio LB sin agitación (inóculo) y extractos de bacterias crecidas en medio LB en agitación (inducido). Las muestras corresponden a: $\sim 5 \times 10^7$ células infectadas para las intracelulares y $\sim 10^8$ bacterias para las extracelulares. Las proteínas FepA (~ 83 kDa) y Fur (~ 17 kDa) se detectaron empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona citoplásmica GroEL (~ 60 kDa).

Tras esta comprobación y con el fin de analizar la expresión de la proteína Fur de *S. Typhimurium* durante la infección, infectamos fibroblastos NRK-49F con la cepa *fur::3xFLAG-kan* y se obtuvieron muestras de bacteria intracelular a 4 y 24 horas después de la infección. Los resultados mostraron que la proteína Fur sigue sintetizándose en la bacteria intracelular incluso 24h post-infección (**Fig. 28B**).

Estos resultados sugieren que, ante la baja concentración de hierro en la SCV del fibroblasto, la proteína Fur estaría desacomplejada (*apo*-Fur) y no regularía negativamente la expresión de los transportadores de hierro *Iron*, *FepA*, *CirA*, *FeoB* y *SitD*. El hecho de que se siga expresando la proteína Fur intracelularmente, a pesar de no estar ejerciendo la función de regulación negativa, no es de extrañar si consideramos que existen observaciones que apuntan a la capacidad de *apo*-Fur de regular positiva o negativamente la expresión de determinados genes (Carpenter *et al.*, 2009).

2.2.4 Procesamiento del transportador de membrana externa *FepA* en la bacteria intracelular.

La proteína *FepA*-3xFLAG se visualizó como dos bandas bien definidas en los experimentos de cinética intracelular en fibroblastos, una de ~83kDa y otra de ~73kDa (**Fig. 26**). Esto sugería un procesamiento en el extremo amino terminal de la proteína *FepA*, dado que ambos productos fueron detectados con el anticuerpo anti-FLAG. Además, el producto de mayor peso molecular se corresponde con el tamaño de la proteína *FepA* íntegra, lo que indica que no todas las moléculas de *FepA* están siendo procesadas. Asimismo, observamos que este procesamiento se dio hasta al menos 72h después de la infección (**Fig. 29**).

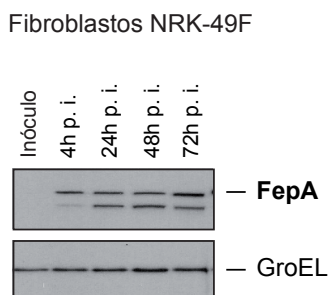


Figura 29. Procesamiento de la proteína etiquetada *FepA* de *S. Typhimurium* intracelular en fibroblastos NRK-49F. Los fibroblastos NRK-49F se infectaron con la cepa *fepA::3xFLAG-kan*. A los diferentes tiempos de infección indicados se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos del inóculo (bacterias cultivadas en medio LB sin agitación). Las muestras corresponden a: ~5x10⁷ células infectadas para las intracelulares y ~10⁸ bacterias para inóculo. La proteína *FepA* (~83kDa), se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona citoplásmica *GroEL* (~60kDa).

Curiosamente, este procesamiento en el extremo amino terminal de FepA no se visualizó durante la infección de células epiteliales HeLa (**Fig. 27**). La diferencia que caracteriza el modelo de infección de *S. Typhimurium* en células HeLa es una tasa de proliferación intracelular unas diez veces superior a la que se da en el modelo de fibroblastos (Martínez-Moya *et al.*, 1998). Por esta razón nos planteamos si esta diferencia en la tasa de crecimiento pudiera estar relacionada con las diferencias en el procesamiento de FepA observadas en ambos modelos de infección. Para demostrarlo, generamos una cepa etiquetada en la proteína FepA y que además portara la mutación en el sistema PhoP/PhoQ (*fepA::3xFLAG-kan* *phoP7953::Tn10*), cuya carencia resulta en sobrecrecimiento en el fibroblasto (Cano *et al.*, 2001). Empleando el mutante *phoP* y la estirpe silvestre para infectar fibroblastos NRK-49F, obtuvimos extractos de bacteria intracelular a diferentes tiempos (4, 8, 24, 48 horas p. i.).

Estos experimentos demostraron que FepA no es procesada en el mutante *phoP* durante la infección de fibroblastos (**Fig. 30A**). Asimismo, realizamos este experimento empleando fibroblastos humanos BJ-5ta con el fin de comprobar si esta característica era común a otro tipo de fibroblastos. Los resultados mostraron el mismo procesamiento de FepA en BJ-5ta que en fibroblastos NRK-49F (**Fig. 30B**). Estos

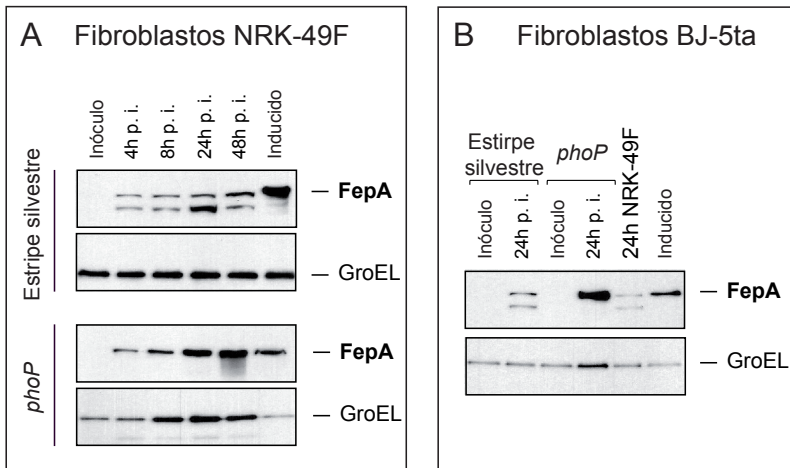


Figura 30. El procesamiento de FepA tiene lugar exclusivamente en la bacteria intracelular en el estado no proliferativo. Visualización de la proteína etiquetada FepA en la estirpe silvestre y el mutante *phoP* intracelular. Se infectaron con estas cepas fibroblastos NRK-49F (A) y BJ-5ta (B). A los diferentes tiempos de infección indicados se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos de bacterias cultivadas en medio LB sin agitación (inóculo) y extractos de bacterias crecidas en medio LB con DTPA (50 μ M) en agitación (inducido). Las muestras corresponden a: $\sim 5 \times 10^7$ células infectadas con la cepa *fepA::3xFLAG-kan*, $\sim 2 \times 10^7$ células infectadas con la cepa *fepA::3xFLAG-kan* *phoP7953::Tn10* y $\sim 10^8$ bacterias para el inóculo y el inducido. La proteína FepA (~ 83 kDa), se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga se empleó la chaperona citoplásmica GroEL (~ 60 kDa).

resultados sugieren que el transportador FepA de *S. Typhimurium* está sufriendo un procesamiento en el ambiente intracelular de fibroblastos que parece estar relacionado con el estado no proliferativo de la bacteria.

Mediante el análisis del peso molecular teórico de las bandas de FepA-3xFLAG visualizadas por Western Blot en bacteria intracelular estimamos que la diferencia aproximada entre la banda de mayor peso molecular y la menor peso molecular era de 9 a 10 kDa. Esta diferencia equivaldría a ~90-100 aminoácidos. La estructura de la proteína FepA de *E. coli* se caracteriza por presentar 22 láminas- β antiparalelas que forman un barril que se encuentra embebido en la membrana externa, y un dominio “tapón” en el amino terminal de aproximadamente 150 residuos (Chakraborty *et al.*, 2007) (**Fig. 31A y B**). La proteína FepA de *E. coli* tiene un 82% de identidad con la de *S. Typhimurium*. Para determinar la zona probable de corte realizamos un examen *in silico* de la estructura tridimensional de FepA de *E. coli* disponible en la base de datos de proteínas PDB (ID: 1FEP) empleando el programa PyMOL de visualización de moléculas (www.pymol.org). Así comprobamos que los residuos 90-100 se ubicaban

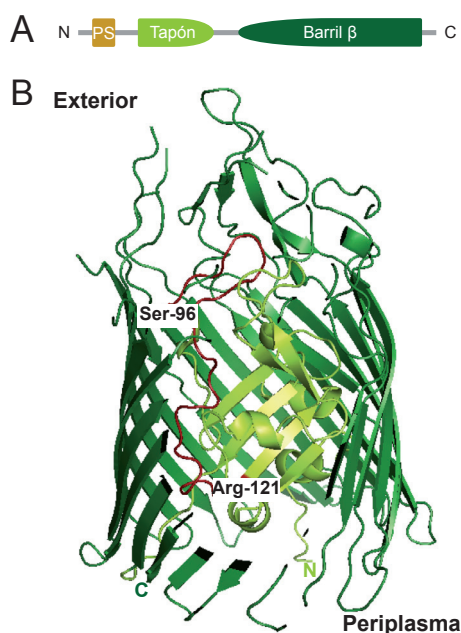


Figura 31. Representación de la estructura secundaria (A) y estructura tridimensional (B) del transportador de membrana externa FepA. Proteína embebida en la membrana externa bacteriana mediante una estructura en barril β (verde oscuro) con un dominio tapón en el centro (verde claro). En rojo se representa el bucle predicho como la zona más probable para el procesamiento intracelular (*bucle L9*), delimitado por los residuos Ser 96 y Arg 121. Imagen generada con el programa PyMOL de visualización de moléculas. Molécula tomada de la base de datos de proteínas (PDB ID: 1FEP). PS: péptido señal; C: extremo carboxilo; N: extremo amino.

en uno de los bucles que forman parte el dominio “tapón” de la proteína y entre las posiciones Ser 96 y Arg 121 (*bucle L9*) (**Fig. 31B**). Los bucles se caracterizan por su flexibilidad y movilidad y, por tanto, podemos considerar que esta zona de la proteína estaría expuesta a la acción de proteasas.

Para poder verificar que el procesamiento ocurría en el *bucle L9*, generamos variantes de la proteína FepA etiquetadas con el epítipo de la hemoaglutinina (HA) próximo a las posiciones Ser 96 y Arg 121 (**Fig. 31**). Además, mantuvimos el epítipo FLAG en el extremo carboxilo de la proteína FepA (**Fig. 32 b y c**). Si el procesamiento ocurría en la zona predicha, los extractos obtenidos al infectar fibroblastos NRK-49F con la cepa *fepA*::1-HA::3xFLAG-*kan* revelarían dos productos correspondientes a la proteína procesada: uno de 9-10 kDa al incubar con el anticuerpo anti-HA y otro de ~73kDa al incubar con anti-FLAG. Para la cepa *fepA*::2-HA::3xFLAG-*kan*, el producto obtenido sería el mismo (~73kDa) al incubar con los dos anticuerpos. Dado que el procesamiento no ocurre en todas las moléculas de FepA quisimos averiguar la localización de las proteínas íntegras y las procesadas. Para ello emplearíamos también las cepas etiquetadas con los epítipos HA y FLAG en ensayos de inmunofluorescencia. Si el procesamiento ocurría en el *bucle L9*, al infectar fibroblastos con la cepa *fepA*::1-HA::3xFLAG-*kan*, la señal del anticuerpo anti-HA colocalizaría con la de anti-FLAG en los caso en los que la proteína FepA estuviera íntegra.

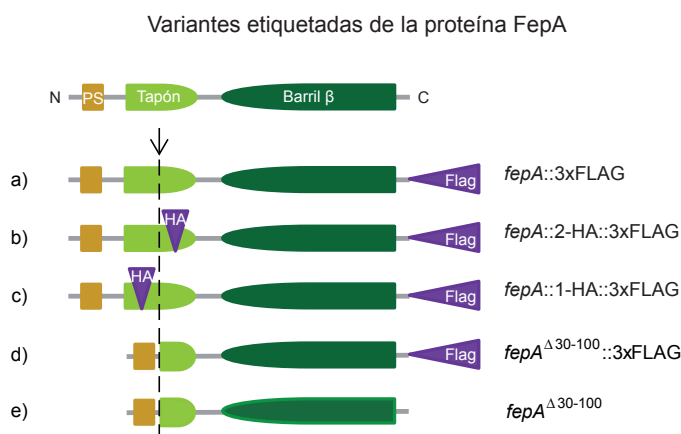


Figura 32. Configuración de las variantes etiquetadas del transportador de membrana externa FepA de *S. Typhimurium*. Péptido señal (PS) (amarillo), dominio “tapón” (verde claro) y barril β (verde oscuro). La flecha y la línea discontinua indican el lugar predicho del procesamiento intracelular. Se han representado a las cepas *fepA*::3xFLAG-*kan* (a), *fepA*::2-HA::3xFLAG-*kan* (b), *fepA*::1-HA::3xFLAG-*kan* (c), *fepA*^{Δ30-100}::3xFLAG-*kan* (d) y *fepA*^{Δ30-100} (e). C: extremo carboxilo; N: extremo amino.

Además, quisimos analizar el efecto que tenía el procesamiento de la proteína FepA en la supervivencia de la bacteria intracelular. Para ello, reproducimos artificialmente el procesamiento intracelular y forzamos a la bacteria a expresar exclusivamente la versión truncada de la proteína. Así, generamos una versión truncada de la proteína FepA carente de los 95 primeros residuos, sin alterar el péptido señal. Una de estas versiones estaba etiquetada en el extremo carboxilo terminal (*fepA*^{Δ30-100}::3xFLAG-kan y *fepA*^{Δ30-100}) (Fig. 32 d y e).

Debido a la señal escasa o nula del anticuerpo anti-HA, los ensayos de Western Blot y de inmunofluorescencia realizados con las cepas *fepA*::2-HA::3xFLAG-kan y *fepA*::1-HA::3xFLAG-kan no ofrecieron resultados concluyentes. Sin embargo, mediante la detección del epítipo FLAG se pudo comprobar que las proteínas FepA etiquetadas con el epítipo HA presentaron varias bandas de tamaños menores a 83kDa, tanto en fibroblastos NRK-49F (Fig. 33A cepas 2 y 3) como en LB con 50 μM de DTPA (Fig. 33B cepas 2 y 3). Este patrón de bandas no aparecía en la cepa *fepA*::3xFLAG-kan en ninguno de los casos (Fig. 33A y B cepa 1). Asimismo, se observó que en la versión truncada de la proteína FepA (*fepA*^{Δ30-100}) se apreciaban claramente dos pro-

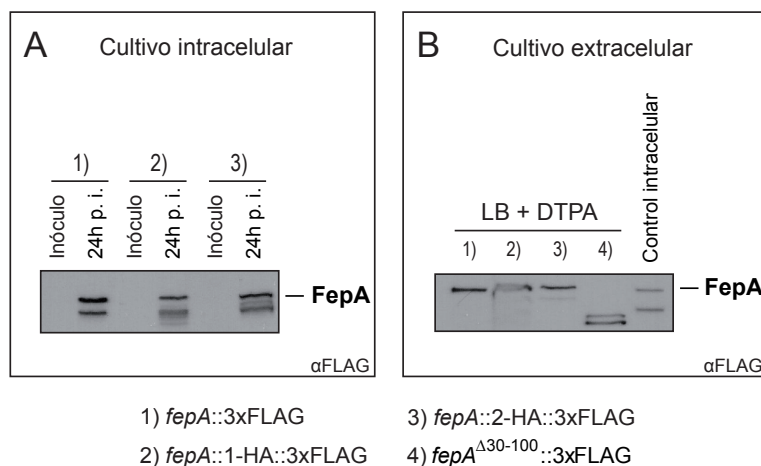


Figura 33. Procesamiento de las variantes de la proteína FepA etiquetadas con los epítipos FLAG y HA o carentes del dominio “tapón”. Se muestran las cepas *fepA*::3xFLAG-kan (1), *fepA*::2-HA::3xFLAG-kan (2), *fepA*::1-HA::3xFLAG-kan (3) y *fepA*^{Δ30-100}::3xFLAG-kan (4) en medio intracelular (A) y extracelular (B). Se infectaron fibroblastos NRK-49F y a 24 horas post-infección se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos bacterias cultivadas en medio LB sin agitación (inóculo). Los cultivos extracelulares se crecieron en medio LB con 50 μM DTPA durante 18h para la posterior extracción de proteínas. Las muestras corresponden a: ~5x10⁷ células infectadas y ~10⁸ bacterias para inóculo y extracelular en medio LB con DTPA. La proteína FepA (~83kDa), se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

ductos cuando la cepa crecía en medio LB con DTPA (**Fig. 33B cepa 4**). En ninguno de los casos anteriores, el patrón de bandas obtenido coincidía con el característico de la proteína FepA de la bacteria intracelular (**Fig. 33 A y B**). Estos resultados sugieren que las modificaciones genéticas realizadas en estas cepas podrían estar provocando cambios conformacionales que hacen a la proteína FepA más vulnerable a la acción de proteasas en el bucle L9.

Estudios previos han demostrado que la carencia de determinados residuos pertenecientes al dominio “tapón” de la proteína FepA son determinantes para el mantenimiento de su función (Chakraborty *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto junto con los resultados mostrados en la **figura 33**, diseñamos un experimento dirigido a averiguar si FepA seguía manteniendo su función al introducir etiquetas HA en la región del dominio tapón o faltar dicho dominio. La carencia simultanea de los sistemas de transporte Iro, Fep y Cir provoca un cambio fenotípico que se ve reflejado en un menor crecimiento comparado con la estirpe silvestre (**Fig. 17**). Aprovechamos esta característica como indicador de la correcta función de la proteína FepA etiquetada con los epítomos FLAG y HA o truncada. Para ello combinamos las diferentes variantes de la proteína FepA (**Fig. 32**) con la doble mutación $\Delta iroBCDEN \Delta cirA$ (**Fig. 34A**). Asimismo, se comprobó que la proteína FepA de las nuevas cepas construidas seguían presentando el mismo patrón de bandas que las cepas originales (**Fig. 34B**).

La disminución en la velocidad de crecimiento observada en las cepas etiquetadas con el epítomo HA o carentes del dominio “tapón” en el fondo genético del mutante $\Delta iroBCDEN \Delta cirA$ fue similar al presentado por la carencia de los sistemas Iro, FepA y CirA (**Fig. 34A**). Este resultado indicaría que estas modificaciones alteran el plegamiento de FepA provocando una pérdida de función. El hecho de que este fenotipo también fuera observado en la cepa con la proteína FepA truncada reafirmaría las observaciones realizadas con mutantes puntuales de *E. coli* en residuos pertenecientes al dominio “tapón” (Chakraborty *et al.*, 2003). Ante estos resultados, podríamos inferir que la proteína FepA de *S. Typhimurium* procesada durante la infección de fibroblastos ha perdido su función como transportador de hierro.

Con el objeto de comprobar si la proteína FepA procesada pudiera tener alguna otra función que afectara al comportamiento de *S. Typhimurium* durante el proceso infeccioso, ensayamos las cepas *fepA* ^{$\Delta 30-100$} y *fepA* ^{$\Delta 30-100$} ::3xFLAG-kan en infección de fibroblastos NRK-49F (**Fig. 35A**) o de células epiteliales HeLa (**Fig. 35B**). Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la supervivencia para ninguna

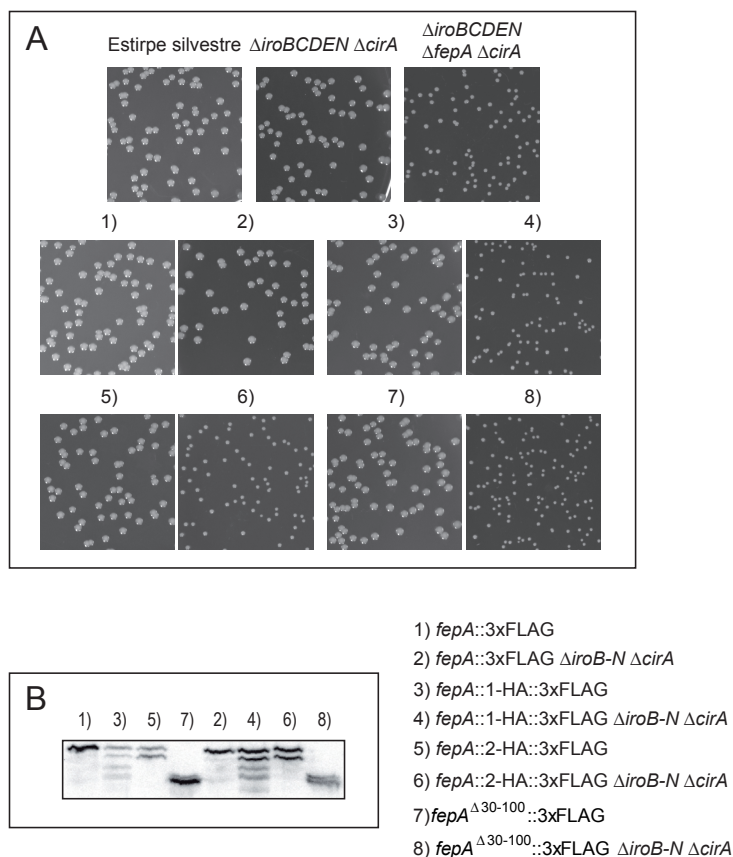


Figura 34. Las variantes de la proteína FepA etiquetadas con los epítomos FLAG y HA o carentes del dominio “tapón” muestran pérdida de funcionalidad. (A) Colonias de las cepas *fepA::3xFLAG-kan*, *fepA::1-HA::3xFLAG-kan*, *fepA::1-HA::3xFLAG-kan* y *fepA^{Δ30-100}::3xFLAG-kan*, *fepA::3xFLAG-kan ΔiroBCDEN ΔcirA*, *fepA::2-HA::3xFLAG-kan ΔiroBCDEN ΔcirA*, *fepA::1-HA::3xFLAG-kan ΔiroBCDEN ΔcirA* y *fepA^{Δ30-100}::3xFLAG-kan ΔiroBCDEN ΔcirA* de *S. Typhimurium* en medio LB agar. Como controles se emplearon la estirpe silvestre SV5015 y las cepas $\Delta iroBCDEN \Delta cirA$ y $\Delta iroBCDEN \Delta fepA::cat \Delta cirA::kan$. (B) Detección de la proteína FepA de *S. Typhimurium* en medio LB con 50 μ M DTPA. Las muestras corresponden a $\sim 10^8$ bacterias. La proteína FepA (~ 83 kDa), se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

de las cepas en ninguna de las dos líneas celulares. Estos resultados sugieren que la presencia exclusiva de una versión truncada la proteína FepA, aun siendo incapaz de transportar hierro, no afecta al comportamiento de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos y células epiteliales.

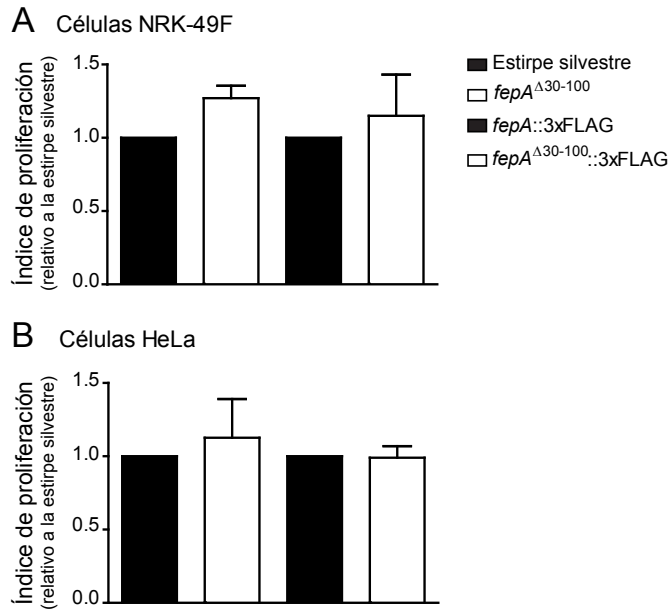


Figura 35. La carencia de función de FepA no altera la capacidad de *S. Typhimurium* de sobrevivir en fibroblastos y células epiteliales HeLa. Índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24h y 2h, en fibroblastos NRK-49F (A) y células epiteliales HeLa (B) de la estirpe silvestre y de las cepas *fepA*^{Δ30-100}::3xFLAG-kan, *fepA*::3xFLAG-kan y *fepA*^{Δ30-100}::3xFLAG-kan de *S. Typhimurium*. Los valores mostrados corresponden a la media y error estándar relativos a las cepas en negro de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando las medias con la estirpe silvestre o con la cepa *fepA*::3xFLAG-kan, en cada caso ($p < 0,05$). Índice de proliferación de la estirpe silvestre en valores absolutos en NRK-49F: $2,04 \pm 0,68$; en HeLa: $12,07 \pm 1,24$.

Puesto que FepA esta localizada en la membrana externa y con el objeto de identificar la proteasa responsable de su procesamiento intracelular, nos centramos en el estudio de proteasas periplásmicas bacterianas. La actividad endopeptidasa de las proteasas SohB y DegS, su localización en el periplasma y los valores de transcripción en positivo de los genes que las codifican en la estirpe silvestre intracelular (**Tabla 3**) son características que las hacían buenas candidatas para su estudio. Asimismo, varios trabajos han demostrado la importancia de estas proteasas para el crecimiento bacteriano bajo condiciones de estrés que alteran la membrana externa (Baird *et al.*, 1991; Bos *et al.*, 2007; Meltzer *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2009).

Tabla 3. Niveles de expresión de los genes *sohB* y *degS* de *S. Typhimurium*. Obtenido a partir de los datos de expresión de transcriptómica de la Tesis Doctoral de la Dra. Núñez Hernández (Núñez-Hernandez, 2008).

		Estirpe silvestre intracelular 24h p.i. relativo a bacteria LB fase exponencial	Mutante <i>phoP</i> intracelular 24h p.i. relativo a bacteria LB fase exponencial
Nombre del gen		M	M
STM1716	<i>sohB</i>	0,50 / 0,84	-0,24 / 0,01
STM3349	<i>degS</i>	0,58 / 1,06	-0,76 / -1,26

Con el fin de comprobar si estas proteasas estaban implicadas en el procesamiento intracelular de FepA, generamos los mutantes $\Delta sohB$ y $\Delta degS$ y estas mutaciones las combinamos con versión etiquetada *fepA::3xFLAG*. Observamos que el mutante $\Delta degS$ presentaba dificultades para crecer en medio LB con 50 μ M de DTPA, alcanzando una DO_{600} final que era casi la mitad de la alcanzada durante el crecimiento en LB (**Fig. 36B**). Por el contrario, la estirpe silvestre mantuvo valores de DO_{600} final similares tanto en LB como en LB con DTPA (**Fig. 36A**).

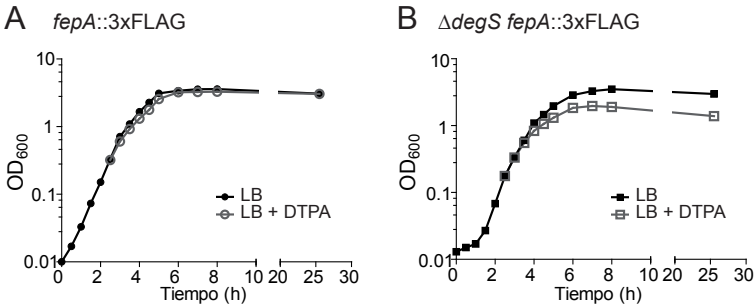


Figura 36. La viabilidad del mutante $\Delta degS$ se ve afectada durante el crecimiento en LB con DTPA. Curva de crecimiento de cepa *fepA::3xFLAG-kan* (A) y $\Delta degS::kan$ *fepA::3xFLAG* (B) de *S. Typhimurium* en LB o en LB con DTPA. Cuando los cultivos llegaron hasta una DO_{600} de 0,2 se dividieron y a la mitad se añadió 50 μ M de DTPA. Los valores representados corresponden a un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes realizados.

DegS forma parte la ruta RpoE (Sigma E) de detección de proteínas mal plegadas de la membrana externa (Meltzer *et al.*, 2009). Bajo condiciones de estrés que alteran la membrana externa, la acción proteolítica de DegS dispara la respuesta de RpoE que induce la expresión de genes como *degP*, que también codifica una proteasa periplásmica (Meltzer *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados mostrados en la **figura 36** sugieren que la adición de quelante al medio de cultivo provoca un estrés que altera la membrana externa dando lugar a la aparición de proteínas mal plegadas que deben ser detectadas y eliminadas. En el mutante $\Delta degS$, estas proteínas mal plegadas no pueden ser eliminadas, lo que conduciría a la muerte de una gran parte de las bacterias.

El índice de proliferación de la cepa $\Delta degS::kan\ fepA::3xFLAG$ en fibroblastos NRK-49F también mostró una diferencia notable respecto a la estirpe silvestre, presentando un valor quince veces inferior al de la estirpe silvestre (**Fig. 37**). Además, a nivel microscópico apreciamos una pérdida de la integridad bacteriana del mutante $\Delta degS$. Esta pérdida de integridad se vio reflejada por la presencia de una mayor cantidad de partículas de lipopolisacárido esparcidas por el interior del fibroblasto en comparación a la estirpe silvestre (**Fig. 38**). Trabajos realizados con *E. coli* también han descrito la pérdida de viabilidad del mutante *degS* tanto en medios de cultivo como en el modelo de infección de ratón (Alba *et al.*, 2001; Redford *et al.*, 2003).

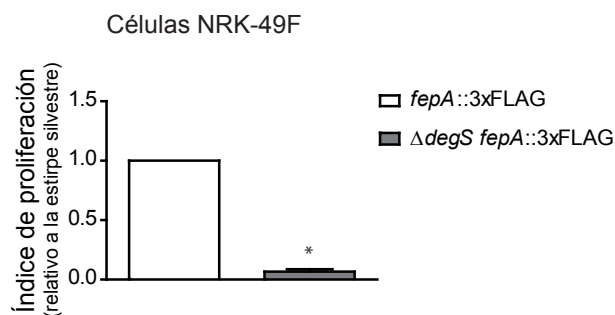


Figura 37. La proteasa DegS es importante para la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos. Índice de proliferación, medido como cociente de bacteria intracelular entre 24h y 2h, de la estirpe silvestre y de la cepa $\Delta degS::kan\ fepA::3xFLAG$ de *S. Typhimurium* en fibroblastos NRK-49F. Los valores mostrados corresponden a la media y error estándar relativos a las estirpe silvestre de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de una vía y post-prueba de Dunnett, comparando la media del mutante con la de la estirpe silvestre ($p < 0,05$). * $p < 0,05$

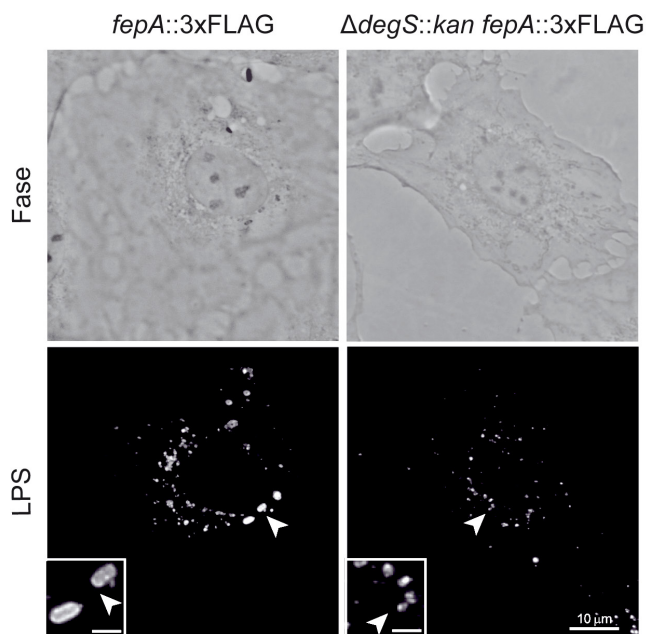


Figura 38. Pérdida de la integridad celular del mutante $\Delta degS$ de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos NRK-49F. Los fibroblastos fueron infectados con la cepa *fepA::3xFLAG-kan* o con la cepa mutante $\Delta degS::kan fepA::3xFLAG$. Tras 24h de infección se detectó la bacteria con un anticuerpo policlonal anti-LPS. Las cabezas de flechas indican las bacterias que aparecen en los paneles ampliados. Las barras de escala de los paneles ampliados representan los 2 μm de longitud.

La detección de la proteína FepA en el mutante $\Delta degS$ tras la infección de fibroblastos NRK-49F reveló una ausencia del procesamiento que esta proteína sufre en la estirpe silvestre intracelular. Sin embargo, el procesamiento de FepA se mantuvo en el caso del mutante $\Delta sohB$ (**Fig. 39A**). Con el objeto de comprobar si la ausencia de procesamiento de FepA observado en la cepa $\Delta degS::kan fepA::3xFLAG$ era debido a la carencia de DegS o a la falta de respuesta RpoE, construimos la cepa $\Delta rpoE::kan fepA::3xFLAG$. La detección de la proteína FepA en esta cepa durante la infección de fibroblastos NRK-49F reveló la presencia de un sólo producto (**Fig. 39B**).

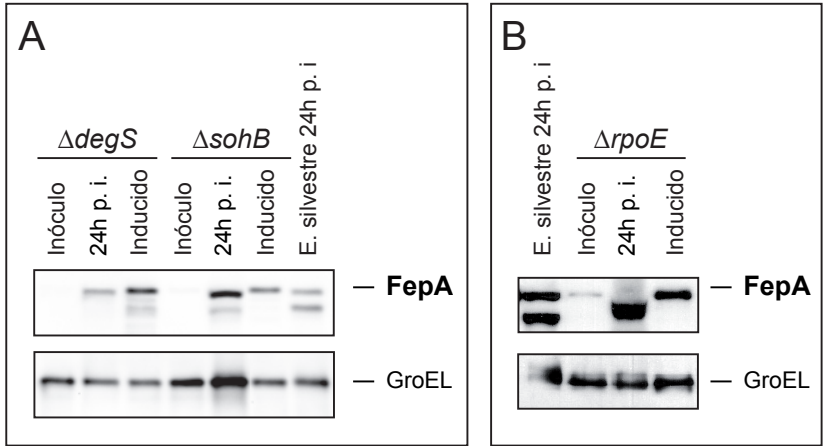


Figura 39. DegS y RpoE están involucrados en el procesamiento intracelular de la proteína FepA de *S. Typhimurium*. Fibroblastos NRK-49F infectados con las cepas $\Delta degS::kan\ fepA::3xFLAG$, $\Delta sohB::kan\ fepA::3xFLAG$ (A) y $\Delta rpoE::kan\ fepA::3xFLAG$ (B). Tras 24 horas de infección se realizó la extracción de proteínas de la bacteria intracelular. Como control se muestran extractos de bacterias cultivadas en medio LB sin agitación (inóculo), en medio LB con 50 μ M DTPA (inducido) y extracto de la cepa $fepA::3xFLAG-kan$ intracelular (control intracelular) . Las muestras corresponden a: $\sim 5 \times 10^7$ células infectadas con $\Delta sohB::kan\ fepA::3xFLAG$ y $\sim 10^8$ células infectadas con $\Delta degS::kan\ fepA::3xFLAG$ y $\Delta rpoE::kan\ fepA::3xFLAG$; y $\sim 10^8$ bacterias inóculo y cultivo inducido. La proteína FepA (~ 83 kDa) se detectó empleando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta mediada por RpoE dirigida a la detección de proteínas mal plegadas de la membrana externa podría estar involucrada en el procesamiento que sufre el transportador FepA durante la infección de fibroblastos.

DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis nos hemos centrado en intentar descifrar funciones que podrían contribuir al establecimiento del estado no proliferativo de *S. Typhimurium* observado en el interior de fibroblastos. Para ello realizamos un nuevo análisis de los datos de transcriptómica obtenidos previamente en el laboratorio con el objeto de identificar genes inducidos exclusivamente en el estado de no crecimiento intracelular (Núñez-Hernández, 2008). Este nuevo análisis incidió en aspectos como la selección de genes inducidos “exclusivamente” en la estirpe silvestre intracelular. Asimismo, hemos intentado definir algunos de los requerimientos nutricionales que la bacteria necesita para mantenerse en un estado no proliferativo en el interior del fibroblasto. En este sentido, las aproximaciones que se realizaron combinaban ensayos con mutantes así como la estimación de los niveles de una determinada proteína en la bacteria intracelular. De este modo hemos podido identificar características relacionadas con el metabolismo del hierro de *S. Typhimurium* que hasta ahora no habían sido descritas en modelos de infección.

Funciones de *S. Typhimurium* involucradas en la adaptación al estado no proliferativo en el interior de fibroblastos.

En este trabajo llevamos a cabo una inactivación selectiva de genes que se encontraban inducidos exclusivamente durante el estado no proliferativo de *S. Typhimurium*. Los ensayos realizados con los mutantes generados no revelaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos. En los pocos casos en los que se apreciaron diferencias, los valores de proliferación intracelular no superaban las 2-3 veces con respecto a la estirpe silvestre. Estas diferencias no podemos considerarlas, por tanto, relevantes si las comparamos con las observadas en el mutante *phoP*, que muestra un índice de proliferación en fibroblastos que llega a ser 30-40 veces superior a la estirpe silvestre (Cano *et al.*, 2001). Los genes inactivados representaron aproximadamente el 30% del total de 124 genes seleccionados en base a los criterios ya mencionados, como la inducción de genes en el ambiente intracelular.

Uno de los pocos mutantes que presentó cambios estadísticamente significativos fue el mutante $\Delta STM4466$ - $STM4467$. Los genes *STM4466* y *STM4467* intervienen en la ruta de la arginina disiminasa (ADI), mediante al cual *S. Typhimurium* podría limitar a la célula hospedadora la obtención de arginina para la producción de NO (Sonck *et al.*, 2009; Mercado-Lubo *et al.*, 2009). Dado que la ruta ADI permite el crecimiento anaeróbico dependiente de arginina (Broman *et al.*, 1978; Gardan *et al.*,

1997; Zúñiga *et al.*, 2002), *S. Typhimurium* podría emplearla como alternativa anaeróbica para la obtención de energía en el fibroblasto. La inducción de los genes de la ruta ADI, *STM4466* y *STM4467*, por la bacteria podría también indicar que el ambiente intravacuolar del fibroblasto es limitante en oxígeno. Este hecho también se ve apoyado por la inducción de genes relacionados con el metabolismo anaeróbico, como los genes *narGHJ* que codifican diferentes nitrato reductasas (Spector *et al.*, 1999; Sohaskey, 2008).

La ausencia de cambios significativos en la mayoría de los mutantes analizados estaría de acuerdo con la notoria “robustez” atribuida al metabolismo de *S. Typhimurium* durante la infección (Becker *et al.*, 2006). En esta situación, la bacteria se adaptaría fácilmente a la hostilidad del ambiente intracelular.

Si bien consideramos que inactivar el 30% de genes seleccionados es una proporción representativa, no podemos descartar que entre el 70% restante se encuentren genes importantes para el establecimiento del estado no proliferativo. Considerando el tipo de resultados obtenidos, parece necesaria una aproximación más generalizada para poder identificar, de existir, funciones críticas para el mantenimiento del estado no proliferativo. Otra limitación de este trabajo viene determinada por nuestra selección de genes exclusivamente inducidos durante el estado no proliferativo de *S. Typhimurium*. Genes cuyos niveles de expresión no varían en la bacteria intracelular respecto a la extracelular pero cuyos productos responden a señales intracelulares pueden ser también importantes. Tal es el caso de los genes *phoP* e *igaA*, que sin ser inducidos por la bacteria intracelular, su carencia conduce a la proliferación de *S. Typhimurium* en fibroblastos (Cano *et al.*, 2001). Asimismo, en trabajos anteriores del laboratorio en los que se inactivaron numerosos reguladores, sólo la deficiencia de los genes *spiA* y *rpoE* condujo a una disminución de la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en fibroblastos (Cano *et al.*, 2001). Los genes *phoP*, *igaA*, *spiA* y *rpoE* son ejemplos que ilustran el relativo bajo número de genes descritos hasta ahora que han mostrado una relación directa con la adaptación al estado no proliferativo de *S. Typhimurium* en fibroblastos.

La validación mediante PCR cuantitativa de los niveles de inducción obtenidos por transcriptómica podría haber dirigido más en detalle la selección de genes a inactivar. Sin embargo, decidimos optar por la generación directa de mutantes dado que supone un esfuerzo similar o incluso menor. De este modo podíamos centrarnos en la búsqueda de genes que pueden favorecer la supervivencia de *S. Typhimurium* en

fibroblastos y que no pudieron ser identificados mediante la aproximación empleada en el trabajo anterior dirigida a obtener mutantes de sobrecrecimiento (Cano *et al.*, 2001).

A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo descrito hasta la fecha cuyo objetivo se ha centrado en la búsqueda de funciones relacionadas con la persistencia intracelular de *S. Typhimurium* mediante la generación de mutantes tomando como referencia datos de transcriptómica de bacteria intracelular.

Requerimientos nutricionales de *S. Typhimurium* en el fibroblasto: fuentes de carbono alternativas.

Durante la infección de fibroblastos *S. Typhimurium* no induce el gen *gntT*, que codifica un transportador de alta afinidad para gluconato (Núñez-Hernández, 2008). Esto sugiere que, al contrario que en macrófagos, posiblemente *S. Typhimurium* utiliza fuentes de carbono alternativas en su adaptación al estado no proliferativo en fibroblastos. La presencia de glicoproteínas lisosomales (Lgp) en la membrana de la SCV nos hizo pensar que azúcares de estas proteínas podrían ser tomadas como fuentes de carbono por la bacteria intracelular (García-del Portillo *et al.*, 1993). Por ejemplo, el disacárido NAcGlc-NAcGlc presente en estas glicoproteínas y para el cual *S. Typhimurium* posee transportadores específicos. El grupo de la Dra. Figueroa-Bossi identificó porinas de membrana de *S. Typhimurium*, ChiP y ChiQ, cuya síntesis se ve inducida por la presencia en el medio de cultivo de quitobiosa (Figueroa-Bossi *et al.*, 2009). La quitobiosa es un disacárido de NAcGlc-NAcGlc derivado de la degradación de polímeros de quitina similar al que aparece como derivación en las glicoproteínas de las células eucariotas. El empleo de cepas etiquetadas en los genes *chiP* y *chiQ* nos permitió analizar los niveles de expresión relativos de estas porinas por *S. Typhimurium* intracelular. *S. Typhimurium* no parece sintetizar ChiP ni ChiQ durante la infección de fibroblastos (**Fig. 12**). Por tanto, estos datos descartarían la presencia de NAcGlc-NAcGlc en el interior de la SCV del fibroblasto.

Requerimientos nutricionales de *S. Typhimurium* en el fibroblasto: el transporte de hierro.

S. Typhimurium dispone de tres vías principales de adquisición de hierro constituidas por los sistemas Iro/Fep/Cir, Fox/Fhu y Feo/Sit (**Fig. 1 y 16**). En los datos de transcriptómica de *S. Typhimurium* intracelular se detectaron niveles de expresión elevados en los sistemas Iro y Sit (**Fig. 13**). Ante este hecho nos propusimos averiguar

la importancia de la limitación de hierro para el mantenimiento del estado no proliferativo de *S. Typhimurium*.

El incremento de la tasa de proliferación de la bacteria tras la adición de sales solubles de hierro (FeCl_3) al medio celular de fibroblastos (**Fig. 14 y 15A**) indicaría que el crecimiento de *S. Typhimurium* podría verse limitado por la concentración de hierro de la vacuola. Esta limitación de hierro también se ve apoyada por los resultados que indican que la bacteria sintetiza los sistemas IroN, FepA, CirA, FeoB y SitD en fibroblastos (**Fig. 26**). Estudios previos han demostrado que la administración de hierro incrementa la virulencia de muchos patógenos, entre los que se incluyen *S. Typhimurium* (Skaar, 2010; Kortman *et al.*, 2012). No obstante, este efecto podría deberse no sólo a un mayor acceso al hierro, sino también a la inhibición de los mecanismo de defensa de la célula eucariota ante la sobrecarga de hierro, tal y como se ha observado en macrófagos (Nairz *et al.*, 2007; Collins, 2003). Sin embargo, la sobrecarga de hierro, lejos de ser tóxica para la bacteria por la producción de radicales hidroxilo, favorece su crecimiento. Estos resultados sugieren que los fibroblastos podrían jugar un papel importante en la infección ya que en ellos *S. Typhimurium* puede variar su tasa de crecimiento en función del hierro disponible. No obstante, hay que tener en cuenta que los fibroblastos empleados son inmortales y su homeostasis de hierro podría ser diferente a la de células *in vivo* (Nairz *et al.*, 2010).

Por otro lado, en la mayoría de los casos la inactivación de los sistemas Iro/Fep/Cir, Fox/Fhu y Feo/Sit no reveló cambios en el comportamiento de la bacteria en fibroblastos (**Fig. 20**). Ni siquiera el mutante ΔfepCGD , que sufría un retardo en el crecimiento extracelular (**Fig. 17, 18 y 19**), presentó cambios a la hora de infectar o sobrevivir en el interior de fibroblastos. Uno de los mutantes que sí presentó diferencias en comparación a la estirpe silvestre en fibroblastos fue el mutante ΔfoxA (**Fig. 20**). El aumento en la proliferación de este mutante (~ 2 veces respecto a la estirpe silvestre) indicaría que la carencia del transportador FoxA puede aportar algún tipo de ventaja a la bacteria intracelular. No obstante, los datos observados en la literatura indican lo contrario. El mutante *foxA* se encuentra atenuado en ratones de forma más acusada incluso que el mutante *tonB*, que forma el complejo responsable de transmitir la energía a los transportadores de hierro de la membrana externa (Kingsley *et al.*, 1999; Janakiraman y Schlauch, 2000). Por lo que es posible que este efecto no sólo sea el resultado de una simple deficiencia en hierro, sugiriendo que FoxA podría intervenir en otros procesos. Sin embargo, no podemos considerar relevantes los cambios

observados en el mutante $\Delta foxA$ si lo comparamos con los mutantes *phoP* e *igaA* de sobrecrecimiento intracelular en fibroblastos (Cano *et al.*, 2001).

La escasa repercusión que tiene la carencia de la mayoría de los sistemas de adquisición de hierro sobre la supervivencia de *S. Typhimurium* en fibroblastos refleja la redundancia de estos sistemas ya observada en estudios *in vivo* con *E. coli* (Redford *et al.*, 2003) y en *S. enterica* (revisado en Janakiraman y Slauch, 2000). Además, se sabe que, aun careciendo de determinados genes, la bacteria es capaz de adaptarse al medio. Por ejemplo, ante la incapacidad de producir salmoquelina, la bacteria responde incrementando la secreción de enterobactina (Crouch *et al.*, 2008). No obstante, estudios *in vivo* sí han revelado la implicación de estos sistemas en la virulencia de *S. Typhimurium*, como el sistema Feo/Sit durante la infección de ratones (Tsolis *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2002; Janakiraman y Slauch, 2000). Las diferencias observadas entre nuestros resultados, centrados en el modelo de infección de fibroblastos, y los obtenidos en animales de experimentación pueden ser explicadas por la presencia *in vivo* de un gran número de factores adicionales, como la respuesta inmune, diferentes concentraciones de nutrientes o la presencia citoquinas, las cuales podrían afectar a la supervivencia y replicación del patógeno (Dandekar *et al.*, 2012). Indudablemente, la infección de otros tipos celulares *in vivo*, como macrófagos, células dendríticas y células epiteliales, podría contribuir a acentuar estas diferencias.

Ante esta situación, nuestra estrategia consistió en combinar mutaciones en varios de los sistemas de adquisición de hierro. Al eliminar por completo el sistema IroN/FepA/CirA (**Fig. 17**) pudimos comprobar su importancia para el crecimiento de la bacteria en LB. Esta conclusión se vio apoyada por el hecho de que la carencia del transportador FepCGD determina el retardo del crecimiento en el mutante carente de el sistema Feo/Sit (**Fig. 18 y 19**). Es probable que el medio LB se componga predominantemente de hierro acomplejado. El hecho de que la adición de sales solubles de hierro ($FeCl_3$) al medio LB restablezca el crecimiento de estos mutantes indicaría que la bacteria es capaz de emplear el sistema Feo/Sit de transporte de ion ferroso para sobrellevar la limitación de hierro. Sin embargo, los resultados apuntan a que el sistema Feo/Sit sería empleado de forma secundaria por la bacteria durante el crecimiento en LB, que parece utilizar prioritariamente el sistema Iro/Fep/Cir.

De forma opuesta, *S. Typhimurium* podría emplear principalmente el sistema Feo/Sit en fibroblastos y de forma secundaria el sistema Iro/Fep/Cir. Este hecho vendría indicado por la pérdida de viabilidad que sufre *S. Typhimurium* ante la carencia

de Feo y Sit (**Fig. 21**). Este resultado, junto al crecimiento de la estipe silvestre intracelular al añadir sales solubles de hierro (FeCl_3) (**Fig. 14**), sugiere que la bacteria accedería prioritariamente a las reservas de hierro libre y que este hierro libre parece ser limitante en el fibroblasto. No obstante, la pérdida de viabilidad del mutante $\Delta\text{feoABC } \Delta\text{sitABCD}$ no parece ser sólo consecuencia de la incapacidad de la bacteria de obtener ion ferroso, ya que la adición al medio de DTPA, un quelante de cationes divalentes, no afectó a la viabilidad de este mutante (**Fig. 25**).

Sorprendentemente, ni el aumento en la concentración de hierro del medio (**Fig. 14 y 15B**) ni la carencia de los sistemas Iro/Fep/Cir, Fhu/Feo y Sit (**Fig. 23 y 24**) afectó al comportamiento de la bacteria durante la infección de células epiteliales HeLa. Esto indicaría que *S. Typhimurium* emplea en células epiteliales otros sistemas de adquisición de hierro, como FoxA, u otros mecanismos no específicos o desconocidos hasta el momento. Asimismo, nuestros resultados demuestran que la bacteria sintetiza los transportadores IroN, FepA, CirA y FeoB durante la infección de células epiteliales HeLa. Estudios transcriptómica realizados en células epiteliales HeLa demostraron también una marcada inducción de los genes de *S. Typhimurium* *fep*, *iro* y *sit* a 6 h p. i. (Hautefort *et al.*, 2008). Estos datos indicarían que la concentración de hierro es también limitante para *S. Typhimurium* en células epiteliales HeLa, pero no lo es tanto como en fibroblastos, donde supone un claro factor que contribuye al estado no proliferativo.

El empleo de diferentes sistemas de adquisición de hierro por *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos y células epiteliales HeLa podría indicar diferencias en los mecanismos de restricción de hierro empleados por los dos tipos celulares. En macrófagos, *S. Typhimurium* podría tener acceso al hierro almacenado por la ferritina eucariota y al parecer incorpora más eficientemente el hierro libre que el acomplejado a la transferrina (Nairz *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2010). Además, se ha postulado que la acidificación de endosomas tempranos conduce a cambios conformacionales en la transferrina y su receptor que promueve la liberación del hierro, lo que podría favorecer que el Fe^{2+} sea la forma predominante del hierro en la vacuola (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). Sin embargo, estos mecanismos no han sido investigados en células epiteliales o en fibroblastos infectados. Por otro lado, se ha observado que la supervivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos se ve afectada por la actividad de la proteína Slc11a1 al limitar el acceso al hierro libre (Jabado *et al.*, 2003). Por lo tanto, aunque la proteína Slc11a1 no parece estar presente en células

no fagocíticas (Gruenheid *et al.*, 1997), no podemos descartar que las diferencias observadas entre células epiteliales y fibroblastos sean debidas a la presencia en estos últimos de una proteína similar a Slc11a1.

La marcada inducción de las proteínas IroN y SitD tras 24h de infección en fibroblastos (**Fig. 26**) valida los resultados obtenidos en los datos de transcriptómica de *S. Typhimurium* intracelular (**Fig. 13**) (Núñez-Hernández *et al.*, 2012). Sin embargo, otros estudios han demostrado que Sit es reprimido en condiciones de cultivo anaeróbicas (Encheva *et al.*, 2009). Por lo tanto, la inducción de Sit durante la infección de fibroblastos resulta contradictoria si tenemos en cuenta los indicios de apuntan a un ambiente de hipoxia en la SCV del fibroblasto (Núñez-Hernández *et al.*, 2012). No obstante, la carencia de los sistemas Iro y Sit por sí solos no conduce a una pérdida de viabilidad de la bacteria, ilustrando nuevamente la redundancia en estos sistemas.

A pesar de la aparente limitación de hierro de la SCV del fibroblasto, *S. Typhimurium* sigue sintetizando la proteína Fur durante la infección (**Fig. 28**). Esto puede ser indicativo de la diversa actividad reguladora ejercida por Fur incluso en ausencia de hierro (Foster y Hall, 1992). Se ha descrito que en *Helicobacter pylori* Fur puede ejercer una regulación positiva en ausencia de hierro (revisado en Carpenter *et al.*, 2009). Del mismo modo se sugiere que la proteína *apo*-Fur puede activar la expresión del gen *iro-28* de *S. Typhimurium* (Foster y Hall, 1992; Hall y Foster, 1996).

Trabajos realizados en otros patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* han empleado mutantes en la caracterización de los sistemas de captación de hierro Feo y Fhu en medios de cultivo (Jin *et al.*, 2006). En *Legionella pneumophila*, otro patógeno intracelular, también se han empleado mutantes para intentar caracterizar el sistema Feo de transporte de hierro durante la infección de macrófagos (Robey y Cianciotto, 2002). Del mismo modo la inactivación de genes de *Francisella tularensis* relacionados con transporte de sideróforos y de ion ferroso (FslE y FupA, respectivamente) han demostrado la importancia de estos sistemas durante la infección en mamíferos (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han estudiado las proteínas encargadas de la captación de grupos hemo, IsdAB, de *Staphylococcus aureus* durante la infección de ratones (Pishchany *et al.*, 2009). No obstante, los estudios a nivel de proteína de los sistemas de captación de hierro son inexistentes en los modelos de células eucariotas infectadas con el patógeno. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que estudia el conjunto de los sistemas de transporte de hierro de un patógeno intracelular durante el proceso infeccioso

empleando técnicas genéticas de inactivación de estos sistemas junto a estudios de estimación de niveles de proteínas que componen los mismos.

Procesamiento intracelular del transportador de catecolatos FepA de *S. Typhimurium* en fibroblastos.

La aparición de dos productos de pesos moleculares diferentes detectados con el anticuerpo anti-FLAG en la cepa *fepA::3xFLAG-kan* nos hizo sospechar que la proteína FepA de *S. Typhimurium* sufre un procesamiento durante la infección de fibroblastos (**Fig. 29**). Este procesamiento probablemente sea provocado por la actividad de una proteasa. El hecho de que siga apareciendo un producto con el peso molecular de la proteína íntegra indica que el procesamiento no afecta a todas las moléculas de FepA. Un caso similar de procesamiento ha sido descrito recientemente en el reovirus aviar. En este tipo de virus se ha observado que la proteína de la capsida interna σA sufre un procesamiento durante la infección de varias líneas celulares, tanto de aves como de mamíferos (Ji *et al.*, 2010). Este procesamiento genera un producto pequeño correspondiente al extremo amino de la proteína y parece ocurrir principalmente en el citoplasma de la célula infectada. Tras el procesamiento, ambos productos parecen acumularse en el núcleo.

La ausencia de procesamiento en la proteína FepA durante la infección de células epiteliales HeLa (**Fig. 27**) así como durante la infección con el mutante *phoP* en fibroblastos NRK-49F (**Fig. 30A**) indicaría una posible relación del procesamiento con el estado de persistencia de *S. Typhimurium*. Además, dado que en los fibroblastos de origen humano BJ-5ta se reproducen los resultados obtenidos con NRK-49F (**Fig. 30B**), podríamos deducir que el procesamiento puede ser una característica típica de la infección de fibroblastos por *S. Typhimurium*.

Por otro lado, PhoP regula numerosos factores de virulencia, entre ellos la remodelación de la superficie bacteriana (Prost y Miller, 2008). Por tanto, hay que tener en cuenta que el mutante *phoP* puede presentar una envuelta desorganizada que afectara al procesamiento de FepA. En este sentido, se ha postulado que la proteína PhoP de *S. Typhimurium* activa de forma indirecta al sistema de dos componentes PmrAB, el cual modifica la composición de la membrana externa bacteriana en respuesta a los niveles de hierro extracelular (Kox *et al.*, 2000). Además, un estudio realizado en nuestro laboratorio reveló que la estructura del antígeno O de la estirpe silvestre presenta una mayor proporción de cadenas cortas en el ambiente intracelular en comparación con el crecimiento extracelular en medio LB (Martínez-Moya, 1999).

Se ha sugerido que la presencia de un antígeno O de cadenas cortas está relacionado con la virulencia de *S. Typhimurium* en ratones y posiblemente con su supervivencia intracelular (Murray *et al.*, 2003). Por el contrario, el mutante *phoP* presenta una mayor proporción de cadenas largas del antígeno O que la estirpe silvestre en el ambiente intracelular (Martínez-Moya, 1999). La mayor proporción de cadenas cortas de antígeno O en la estirpe silvestre podría provocar una mayor exposición de los componentes de la membrana externa al ambiente intracelular de fibroblastos, entre ellos la proteína FepA. La abundancia de cadenas largas en el mutante *phoP* podría estar protegiendo a la proteína FepA de la acción de proteasas. Por lo tanto, no podemos afirmar que exista una relación directa entre la ausencia del procesamiento de FepA en el mutante *phoP* y el sobrececimiento intracelular de este mutante en fibroblastos.

Ante estos resultados nos preguntamos: ¿qué sentido biológico tiene el procesamiento que sufre la proteína FepA durante la infección de fibroblastos? Un trabajo reciente en *Chlamydia trachomatis* ha demostrado la existencia de un dominio regulador en el extremo C-terminal de la proteína YgtC, la cual forma parte de un transportador de hierro tipo ABC de la membrana interna (Thompson *et al.*, 2012). La proteína YgtC sufre un procesamiento durante la infección de células epiteliales HeLa por *C. trachomatis* que conduce a la liberación del dominio regulador, denominado YgtR. Además, se ha observado que el dominio YgtR es capaz de regular el operon *ygtABCD* al que pertenece (Thompson *et al.*, 2012). Por lo tanto, no hay que descartar que extremo N- terminal de la proteína FepA, que queda liberado tras el procesamiento de ésta, cumpla alguna función desconocida hasta el momento.

No obstante, desconocemos si todas las moléculas de FepA son procesadas por igual dentro de la misma bacteria o si este procesamiento es específico y exclusivo de determinadas poblaciones bacterianas dentro del mismo fibroblasto. La construcción de variantes etiquetadas de la proteína FepA no nos permitió identificar la localización intracelular de las proteínas FepA procesadas (datos no mostrados). Estas variantes tampoco nos permitieron identificar si el corte estaba ocurriendo en el bucle L9. No obstante, sí conseguimos comprobar que la pérdida del dominio “tapón” de FepA en un mutante $\Delta iroBCDEN \Delta cirA$ resultó en un fenotipo similar al del mutante $\Delta iroBCDEN \Delta fepA \Delta cirA$ (Fig. 34A). Esto posiblemente sea debido a la pérdida de uno los residuos del complejo formado por dos argininas y dos glutamatos localizados en el dominio “tapón” y en el barril beta respectivamente. Las evidencias

indican que la integridad estructural de este complejo es esencial para el transporte de enterobactina (Chakraborty *et al.*, 2003). Esto indicaría que la proteína FepA procesada durante la infección del fibroblasto podría ser incapaz de transportar los ferri-catecolatos eficientemente al interior de la bacteria.

La presencia exclusiva de una versión truncada de FepA, y por tanto carente de función, no afecta al comportamiento de *S. Typhimurium* en el interior del fibroblasto (**Fig. 35A**), al igual que ocurre con el mutante $\Delta fepA$ (**Fig. 20**). Del mismo modo, durante la infección de células epiteliales HeLa, donde el procesamiento no ocurre de forma natural, tampoco se apreciaron cambios provocados por la presencia exclusiva de la versión truncada de FepA (**Fig. 35B**). Por tanto, la presencia de una molécula de FepA incompleta y carente de función no parece afectar al comportamiento de *S. Typhimurium* durante la infección de fibroblastos o células epiteliales HeLa.

La proteasa responsable de procesamiento intracelular de FepA en fibroblastos podría ser de origen eucariota. Se ha descrito que las proteasas lisosomales están presentes en todos los compartimentos de la ruta endocítica (Brix, 2005), como la SCV del fibroblasto. Las proteasas lisosomales cathepsina D (aspartil proteinasas) o cathepsina B, H y L (cistein proteasas) podrían estar actuando en el procesamiento intracelular de FepA. Sin embargo, la adición de inhibidores de proteasas (leupeptina y pepstatina A) al medio de cultivo en ensayos de infección no nos aportó resultados concluyentes (datos no mostrados).

Ante la posibilidad de que la responsable del procesamiento intracelular de FepA pudiera ser una proteasa de *S. Typhimurium* decidimos estudiar las proteasas periplásmicas DegS y SohB. La carencia de DegS afecta a la supervivencia de la bacteria tanto por la presencia de DTPA en el medio LB (**Fig. 36**), como durante la infección de fibroblastos (**Fig. 37 y 38**). Otros trabajos han demostrado la pérdida de viabilidad del mutante *degS* bajo diversas situaciones de estrés que pueden estar afectando a la integridad de las proteínas de membrana externa. Por ejemplo, el mutante *degS* de *E. coli* no es tan tolerante al estrés por calor o etanol como la estirpe silvestre (Redford *et al.*, 2003). Este mutante también parece verse afectado durante infecciones intra-peritoneales o del tracto urinario en ratones. DegS interviene en la respuesta RpoE (sigma E) de detección y degradación de proteínas mal plegadas de la membrana externa. Se sabe que DegS degrada al factor anti-sigma E (RseA) con la consecuente liberación de RpoE. RpoE induce genes como *degP* cuyo producto es una proteasa encargada de degradar las proteínas mal plegadas de la membrana externa (Clausen

y Southan, 2002; Meltzer *et al.*, 2009). La falta de activación de RpoE por DegS puede ser la responsable de la pérdida de viabilidad del mutante *degS* de *S. Typhimurium*, al igual que ocurre en *E. coli* (Alba *et al.*, 2001). Del mismo modo que ocurre con el mutante $\Delta degS$, la carencia de RpoE conduce a una pérdida de viabilidad durante la infección de fibroblastos (Cano *et al.*, 2001). Por el contrario, la supervivencia extracelular e intracelular del mutante $\Delta sohB$ no se vio afectada. Estos resultados se ven apoyados por los obtenidos en *E. coli*, donde se postula que SohB no es esencial cuando la bacteria se ve sometida a estrés por calor (Baird *et al.*, 1991).

Los sistemas antibacterianos del hospedador podrían conducir a la acumulación de proteínas desnaturalizadas en el patógeno (Clausen y Southan, 2002). Las proteínas mal plegadas localizadas en la membrana externa son activadoras de la respuesta RpoE. Estas proteínas mal plegadas pueden aparecer también cuando la proteína es sobreproducida artificialmente o ante proteínas híbridas, recombinantes o desestructuradas (Meltzer *et al.*, 2009; Clausen y Southan, 2002). La actividad proteasa de DegS es activada por el extremo C-terminal de las proteínas mal plegadas (Meltzer *et al.*, 2009). En el extremo C-terminal de la proteína FepA es donde se ubica el epítipo FLAG de nuestra cepa recombinante *fepA::3xFLAG*. Por lo tanto, es posible que la proteína FepA etiquetada este siendo reconocida por DegS como proteína mal plegada y sea degradada por DegP. La ausencia de procesamiento observada durante la infección de fibroblastos con los mutantes $\Delta degS$ y $\Delta rpoE$ apoyarían esta hipótesis (Fig. 39).

Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la ausencia de procesamiento de FepA en la bacteria carente del sistema PhoPQ ni durante la infección de células epiteliales HeLa. Tampoco explicaría el hecho de que el procesamiento de la proteína FepA sea exclusivo del ambiente intracelular y que tampoco ocurra en las demás proteínas etiquetadas (IroN, CirA, FeoB, SitD). Por otro lado, la implicación de la proteína DegP en el procesamiento de FepA parece improbable. Los sitios de preferencia de corte de la proteasa DegP son Val/Xaa o Ile/Xaa localizados en sitios hidrofóbicos de la proteína (Clausen y Southan, 2002). Existe una valina a la altura del residuo 96, al comienzo del bucle L9 de la proteína FepA. No obstante, la acción de DegP en este punto implicaría que FepA debe estar al menos parcialmente desplegada. Además, DegP es una endoproteasa que degrada las proteínas mal plegadas en péptidos pequeños de un tamaño definido (Meltzer *et al.*, 2009), que no daría lugar al patrón de bandas discretas observado. La infección de fibroblastos con un mutante $\Delta degP$ nos

permitirá esclarecer este punto en un futuro.

Aunque los resultados apuntan a un modelo en el que el sistema RpoE está implicado en el procesamiento de FepA, no podemos descartar que DegS esté realizando una función proteasa independiente de RpoE. Las evidencias que indican que DegS no parece ser responsable de la activación de RpoE a pH ácido (Muller *et al.*, 2009) nos permitirían especular que en fibroblastos DegS podría jugar un papel alternativo que la involucre directamente al procesamiento de la proteína FepA. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la ausencia de procesamiento intracelular de FepA ante la carencia de las proteínas DegS y RpoE puede ser consecuencia de la pérdida de viabilidad observada en los mutantes $\Delta rpoE$ (Cano *et al.*, 2001) y $\Delta degS$ (**Fig. 36 y 37**). El procesamiento intracelular podría estar ocurriendo sólo en algunas bacterias. De ser así, existirían dos poblaciones bacterianas en el interior del fibroblasto diferenciadas por la integridad del transportador FepA. Es posible que el procesamiento intracelular se deba a una falta de adaptación de la bacteria al ambiente intravacuolar del fibroblasto. Si las bacterias carentes de RpoE que sobreviven son las que consiguen adaptarse al estrés del ambiente intracelular, estaríamos detectando las proteínas de las bacterias mejor adaptadas y por tanto sólo aquellas que presentan el transportador FepA íntegro.

Hasta el momento no hemos encontrado evidencias de un procesamiento similar al de la proteína FepA en otras proteínas de la membrana externa de *S. Typhimurium*. El diseño de nuevos experimentos dirigidos a identificar el lugar exacto de acción de la proteasa y la localización intracelular de la proteína procesada nos ayudarán a esclarecer el significado biológico de este procesamiento.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

Primera. La adaptación de *S. enterica* serovar Typhimurium al estado no proliferativo dentro de la vacuola del fibroblasto podría verse dictada por la acción de numerosos genes con funciones redundantes.

Segunda. Las baja disponibilidad de hierro en la vacuola podrían limitar la proliferación de *S. enterica* serovar Typhimurium en el fibroblasto.

Tercera. La vía adquisición de sideróforos tipo catecolatos, formado por los transportadores Iro, Fep y Cir, es empleada preferentemente para asegurar un crecimiento óptimo de *S. enterica* serovar Typhimurium en medio LB.

Cuarta. Al contrario que en la bacteria crecida en medios de laboratorio, durante la infección de fibroblastos *S. enterica* serovar Typhimurium emplea preferentemente los transportadores Feo y Sit de adquisición de ion ferroso.

Quinta. El transportador de ferri-catecolatos FepA de *S. enterica* serovar Typhimurium es procesado por la bacteria localizada en el interior de fibroblastos en el estado no proliferativo. La respuesta RpoE (sigma E) de detección de proteínas de membrana mal plegadas estaría implicada en el procesamiento de este transportador.

BIBLIOGRAFÍA

- Agbor, T. a y McCormick, B. a (2011). *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cellular microbiology*, 13(12) , 1858–69.
- Alba, B.M., Zhong, H.J., Pelayo, J.C., y Gross, C.A. (2001). *degS (hhoB)* is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity. *Molecular microbiology*, 40(6) , 1323–33.
- Alonso, A. y García-Del Portillo, F. (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiology*, 181–191.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., y Rodríguez-Quiriones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3) , 215–237.
- Bagg, A. y Neilands, J.B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26(17) , 5471–7.
- Baird, L., Lipinska, B., Raina, S., y Georgopoulos, C. (1991). Identification of the *Escherichia coli sohB* gene, a multicopy suppressor of the HtrA (DegP) null phenotype. *Journal of bacteriology*, 173(18) , 5763–70.
- Baumler, A.J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends in microbiology*, (8) , 318–322.
- Bearson, B.L., Bearson, S.M.D., Uthe, J.J., Dowd, S.E., Houghton, J.O., Lee, I., Toscano, M.J., y Lay, D.C. (2008). Iron regulated genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to norepinephrine and the requirement of *fepDGC* for norepinephrine-enhanced growth. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 10(7) , 807–16.
- Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., Meyer, T.F., Mann, M., y Bumann, D. (2006). Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature*, 440(7082) , 303–7.
- Beinert, H., Holm, R.H., y Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5326) , 653–9.
- Benjamin, J.-A.M., Desnoyers, G., Morissette, A., Salvail, H., y Massé, E. (2010). Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(3) , 264–72.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., y Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2) , 99–109.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G.J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K., y Süssmuth, R.D. (2004). The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biomaterials : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 17(4) , 471–81.
- Blackwell, J.M., Searle, S., Mohamed, H., y White, J.K. (2003). Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the *lty/lsh/bcg/nramp1/slc11a1* gene story. *Immunology Letters*, 85(2) , 197–203.
- Bos, M.P., Robert, V., y Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual review of microbiology*, 61, 191–214.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., y Gros, P. (2002). Acquisition of Mn (II) in addition to Fe (II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 70(11) , 6032–6042.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P., y Cellier, M.F.M. (2002). Acquisition of Mn (II) in Addition to Fe (II) Is Required for Full Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 70(11) .
- Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G. a, y Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *Journal of bacteriology*, 189(5) , 1489–95.
- Brix, K. (2005). Lysosomal Proteases: Revival of the Sleeping Beauty. "LYSOSOMES."
- Broman, K., Lauwers, N., Stalon, V., y Wiame, J.M. (1978). Oxygen and nitrate in utilization by *Bacillus licheniformis* of the arginase and arginine deiminase routes of arginine catabolism and other factors affecting their syntheses. *Journal of bacteriology*, 135(3) , 920–7.
- Bäumler, A.J., Winter, S.E., Thiennimitr, P., y Casadesús, J. (2011). Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5) , 508–517.

- Cano, D., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesús, J., y García-del Portillo, F. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infection and immunity*, 69(10) , 6463–6474.
- Cano, D., Pucciarelli, M., Martínez-Moya, M., Casadesús, J., y García-del Portillo, F. (2003). Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infection and immunity*, 71(7) , 3690–3698.
- Carpenter, B.M., Whitmire, J.M., y Merrell, D.S. (2009). This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infection and immunity*, 77(7) , 2590–601.
- Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., y Andrews, S.C. (2006). Feo—transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 19(2) , 143–57.
- Chakraborty, R., Lemke, E. a, Cao, Z., Klebba, P.E., y Helm, D. van der (2003). Identification and mutational studies of conserved amino acids in the outer membrane receptor protein, FepA, which affect transport but not binding of ferric-enterobactin in *Escherichia coli*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 16(4) , 507–18.
- Chakraborty, R., Storey, E., y Helm, D. van der (2007). Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 20(3-4) , 263–74.
- Chan, K., Baker, S., Kim, C.C., Detweiler, C.S., Dougan, G., y Falkow, S. (2003). Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *Journal of bacteriology*, 185(2) , 553–63.
- Chan, R.K., Botstein, D., Watanabe, T., y Ogata, Y. (1972). Specialized transduction of tetracycline resistance by phage P22 in *Salmonella* typhimurium. II. Properties of a high-frequency-transducing lysate. *Virology*, 50(3) , 883–898.
- Cherepanov, P.P. y Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1) , 9–14.
- Clarke, T.E., Rohrbach, M.R., Tari, L.W., Vogel, H.J., y Köster, W. (2002). Ferric hydroxamate binding protein FhuD from *Escherichia coli*: mutants in conserved and non-conserved regions. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 15(2) , 121–31.
- Clausen, T. y Southan, C. (2002). The HtrA Family of Proteases:: Implications for Protein Composition and Cell Fate. *Molecular cell*, 10, 443–455.
- Collins, H.L. (2003). The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunology letters*, 85(2) , 193–5.
- Crouch, M.-L.V., Castor, M., Karlinsey, J.E., Kalhorn, T., y Fang, F.C. (2008). Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*, 67(5) , 971–83.
- Dandekar, T., Astrid, F., Jasmin, P., y Hensel, M. (2012). *Salmonella enterica*: a surprisingly well-adapted intracellular lifestyle. *Frontiers in microbiology*, 3(May) , 164.
- Datsenko, K. a y Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12) , 6640–5.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., y Lodish, H.F. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8) , 2258–62.
- Drago-Serrano, M. (2009). Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica*. *Rev Biomed*, 20(1100) , 41–54.
- Drecktrah, D., Knodler, L. a, Howe, D., y Steele-Mortimer, O. (2007). *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(3) , 212–25.
- Drecktrah, D., Knodler, L. a, Ireland, R., y Steele-Mortimer, O. (2006). The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(1) , 39–51.

- Encheva, V., Shah, H.N., y Gharbia, S.E. (2009). Proteomic analysis of the adaptive response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to growth under anaerobic conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 7) , 2429–41.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., y Hinton, J.C.D. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, 47(1) , 103–18.
- Faucher, S.P., Porwollik, S., Dozois, C.M., McClelland, M., y Daigle, F. (2006). Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6) , 1906–11.
- Figueira, R. y Holden, D.W. (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 5) , 1147–61.
- Figueroa-Bossi, N., Valentini, M., Malleret, L., Fiorini, F., y Bossi, L. (2009). Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes & development*, 23(17) , 2004–15.
- Fink, S.L. y Cookson, B.T. (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular microbiology*, 9(11) , 2562–70.
- Finlay, B.B. y Falkow, S. (1988). Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie*, 70(8) , 1089–1099.
- Fischbach, M. a, Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R.J., Liu, D.R., Raymond, K.N., Wanner, B.L., Strong, R.K., Walsh, C.T., Aderem, A., y Smith, K.D. (2006). The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44) , 16502–7.
- Flannagan, R.S., Cosío, G., y Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7(5) , 355–66.
- Flo, T., Smith, K., Sato, S., y Rodriguez, D. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 917–921.
- Foster, J.W. y Hall, H.K. (1992). Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *Journal of bacteriology*, 174(13) , 4317–23.
- Fritsche, G., Dlaska, M., Barton, H., Theurl, I., Garimorth, K., y Weiss, G. (2003). Nramp1 functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4) , 1994–8.
- Fritsche, G., Nairz, M., Libby, S.J., Fang, F.C., y Weiss, G. (2012). Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *Journal of leukocyte biology*.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(9) , 710–20.
- Garai, P., Gnanadhas, D., y Chakravorty, D. (2012). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence*, 3(4) , -1.
- Garcia-del Portillo, F. y Finlay, B.B. (1995). Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *The Journal of cell biology*, 129(1) , 81–97.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J.W., y Finlay, B.B. (1993). Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun*, 61(10) , 4489–4492.
- Garcia-del Portillo, F., Zwick, M.B., Leung, K.Y., y Finlay, B.B. (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22) , 10544–8.
- García-del Portillo, F. (2001). *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 3(14-15) , 1305–11.
- García-del Portillo, F., Foster, J.W., Maguire, M.E., y Finlay, B.B. (1992). Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium* containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 6(22) , 3289–3297.

- Gardan, R., Rapoport, G., y Débarbouillé, M. (1997). Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 24(4) , 825–37.
- Geddes, K., Cruz, F., y Heffron, F. (2007). Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS pathogens*, 3(12) , e196.
- Gehring, A. y Bradley, K. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE. *Biochemistry*, 2960(97) , 8495–8503.
- Gerlach, R.G. y Hensel, M. (2007). *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 120(7-8) , 317–27.
- Gog, J.R., Murcia, A., Osterman, N., Restif, O., McKinley, T.J., Sheppard, M., Achouri, S., Wei, B., Mastroeni, P., Wood, J.L.N., Maskell, D.J., Cicuta, P., y Bryant, C.E. (2012). Dynamics of *Salmonella* infection of macrophages at the single cell level. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*.
- Gopinath, S., Carden, S., y Monack, D. (2012). Shedding light on Salmonella carriers. *Trends in microbiology*, 20(7) , 320–327.
- Grant, A.J., Foster, G.L., McKinley, T.J., Brown, S.P., Clare, S., Maskell, D.J., y Mastroeni, P. (2009). Bacterial growth rate and host factors as determinants of intracellular bacterial distributions in systemic *Salmonella enterica* infections. *Infection and immunity*, 77(12) , 5608–11.
- Grassl, G.A. y Finlay, B.B. (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current opinion in gastroenterology*, 24(1) , 22–6.
- Grassl, G.A., Valdez, Y., Bergstrom, K.S.B., Vallance, B.A., y Finlay, B.B. (2008). Chronic enteric *Salmonella* infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. *Gastroenterology*, 134(3) , 768–80.
- Grimont, P.A.D. y Weill, F.X. (2007). Antigenic Formula of the Salmonella Serovars.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., y Gros, P. (1997). Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of experimental medicine*, 185(4) , 717–30.
- Hall, H.K. y Foster, J.W. (1996). The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *Journal of bacteriology*, 178(19) , 5683–91.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4) , 557–580.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., y Winkelmann, G. (2003). Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7) , 3677–82.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., y Miller, S.I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1) , 53–66.
- Hautefort, I., Thompson, a, Eriksson-Ygberg, S., Parker, M.L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J.M., Ahmad, N., Rhen, M., y Hinton, J.C.D. (2008). During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cellular microbiology*, 10(4) , 958–84.
- Headley, V.L. y Payne, S.M. (1990). Differential protein expression by *Shigella flexneri* in intracellular and extracellular environments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(11) , 4179–4183.
- Helaine, S., Thompson, J. a, Watson, K.G., Liu, M., Boyle, C., y Holden, D.W. (2010). Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8) , 3746–51.
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3) , 95–102.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., y Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142(1) , 24–38.
- Ikeda, J., Janakiraman, A., y Kehres, D. (2005). Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur. *Journal of Bacteriology*, 187, 912–922.

- Iwata, R., Ito, H., Hayashi, T., Sekine, Y., Koyama, N., y Yamaki, M. (1995). Stable and general-purpose chemiluminescent detection system for horseradish peroxidase employing a thiazole compound enhancer and some additives. *Analytical biochemistry*, 231(1), 170–4.
- Jabado, N., Cuellar-Mata, P., Grinstein, S., y Gros, P. (2003). Iron chelators modulate the fusogenic properties of *Salmonella*-containing phagosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6127–32.
- Janakiraman, A. y Slauch, J.M. (2000). The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* typhimurium. *Molecular microbiology*, 35(5), 1146–55.
- Ji, W.T., Lin, F.L., Wang, Y.C., Shih, W.L., Lee, L.H., y Liu, H.J. (2010). Intracellular cleavage of sigmaA protease of avian reovirus. *Virus research*, 149(1), 71–7.
- Jin, B., Newton, S.M.C., Shao, Y., Jiang, X., Charbit, A., y Klebba, P.E. (2006). Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 59(4), 1185–98.
- Johnson, E.E. y Wessling-Resnick, M. (2011). Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and Infection*, 14(3), 207–16.
- Kelly, B.G., Vespermann, A., y Bolton, D.J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(5), 969–77.
- Killmann, H., Herrmann, C., Wolff, H., y Braun, V. (1998). Identification of a new site for ferrichrome transport by comparison of the FhuA proteins of *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, and *Pantoea agglomerans*. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3845–52.
- Kingsley, R. a, Reissbrodt, R., Rabsch, W., Ketley, J.M., Tsois, R.M., Everest, P., Dougan, G., Bäuml, A., Roberts, M., y Williams, P.H. (1999). Ferrioxamine-mediated Iron(III) utilization by *Salmonella enterica*. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1610–8.
- Kortman, G.A.M., Boleij, A., Swinkels, D.W., y Tjalsma, H. (2012). Iron availability increases the pathogenic potential of *Salmonella typhimurium* and other enteric pathogens at the intestinal epithelial interface. *PLoS one*, 7(1), e29968.
- Kox, L.F., Wösten, M.M., y Groisman, E.A. (2000). A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *The EMBO journal*, 19(8), 1861–72.
- Larsen, N.A., Lin, H., Wei, R., Fischbach, M.A., y Walsh, C.T. (2006). Structural Characterization of Enterobactin Hydrolase IroE. *Biochemistry*, (4), 10184–10190.
- Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., y Monack, D.M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS pathogens*, 2(2), e11.
- Malik-Kale, P., Winfree, S., y Steele-Mortimer, O. (2012). The bimodal lifestyle of intracellular *Salmonella* in epithelial cells: replication in the cytosol obscures defects in vacuolar replication. *PLoS one*, 7(6), e38732.
- Maloy, S.R. (1990). Experimental techniques in bacterial genetics. *Jones and Bartlett Publishers, Boston*.
- Martínez-Moya, M, Pedro, M. a de, Schwarz, H., y García-del Portillo, F. (1998). Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Research in microbiology*, 149(5), 309–18.
- Martínez-Moya, Marina (1999). Estudio del Fenómeno de Persistencia de *Salmonella* Typhimurium en células eucariotas no fagocíticas.
- Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G., y Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in microbiology*, 10(2), 140–5.
- Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O., y Maskell, D. (2009). A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nature reviews. Microbiology*, 7(1), 73–80.
- Matzanke, B.F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A.X., y Hantke, K. (2004). FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry*, 43(5), 1386–92.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., y Wilson, R.K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852–6.

- McDowall, K.J., Lin-Chao, S., y Cohen, S.N. (1994). A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem*, 269(14) , 10790–10796.
- McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D., y Koronakis, V. (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current opinion in microbiology*, 12(1) , 117–24.
- Meltzer, M., Hasenbein, S., Mamant, N., Merdanovic, M., Poepsel, S., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Krojer, T., Clausen, T., y Ehrmann, M. (2009). Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of *Escherichia coli*. *Research in microbiology*, 160(9) , 660–6.
- Mercado-Lubo, R., Leatham, M.P., Conway, T., y Cohen, P.S. (2009). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infection and immunity*, 77(4) , 1397–405.
- Miao, E.A., Rajan, J.V., y Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews*, 243(1) , 206–14.
- Monack, D.M., Bouley, D.M., y Falkow, S. (2004). *Salmonella* typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1+/- mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *The Journal of experimental medicine*, 199(2) , 231–41.
- Muller, C., Bang, I.-S., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J., y Fang, F.C. (2009). Acid stress activation of the sigma(E) stress response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*, 71(5) , 1228–38.
- Murray, G.L., Attridge, S.R., y Morona, R. (2003). Regulation of *Salmonella* typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Molecular microbiology*, 47(5) , 1395–406.
- Müller, S.I., Valdebenito, M., y Hantke, K. (2009). Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 22(4) , 691–5.
- Nairz, M., Fritsche, G., Crouch, M.-L.V., Barton, H.C., Fang, F.C., y Weiss, G. (2009). Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cellular microbiology*, 11(9) , 1365–81.
- Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T., y Weiss, G. (2010). The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cellular microbiology*, 12(12) , 1691–702.
- Nairz, M., Theurl, I., Ludwiczek, S., Theurl, M., Mair, S.M., Fritsche, G., y Weiss, G. (2007). The coordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular *Salmonella* typhimurium. *Cellular microbiology*, 9(9) , 2126–40.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., y Buchanan, S.K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, 64(April), 43–60.
- Núñez-Hernández, C. (2008). Estudio de la Interacción *Salmonella*-Fibroblasto Mediante Transcriptómica: Caracterización de Respuestas Ligadas a la Atenuación del Crecimiento Intracelular del Patógeno. *Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias*.
- Núñez-Hernández, C., Pucciarelli, M.G., Tierrez, A., Ortega, A.D., Godoy, M., Gonzalo-Asensio, J., Eisman, B., Casadesus, J., y García-del Portillo, F. (2012). Coincident Activation of the Pathogenicity Islands SPI-1 and SPI-2 Restricts *Salmonella* Growth Inside Host Cells. *Enviado a publicación*.
- Oliveros, J.C. (2007). FIESTA at BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates (<http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA>).
- Pan, X., Tamilselvam, B., Hansen, E.J., y Daefler, S. (2010). Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC microbiology*, 10, 64.
- Patel, J.C., Rossanese, O.W., y Galán, J.E. (2005). The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. *Trends in pharmacological sciences*, 26(11) , 564–70.
- Peacock, R.S., Andrushchenko, V.V., Demcoe, a R., Gehmlich, M., Lu, L.S., Herrero, A.G., y Vogel, H.J. (2006). Characterization of TonB interactions with the FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 19(2) , 127–42.
- Pishchany, G., Dickey, S.E., y Skaar, E.P. (2009). Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components IsdA and IsdB. *Infection and immunity*, 77(7) , 2624–34.

- Prost, L.R. y Miller, S.I. (2008). The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cellular microbiology*, 10(3) , 576–82.
- Rabsch, W., Methner, U., y Voigt, W. (2003). Role of receptor proteins for enterobactin and 2, 3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 71(12) , 6953–6961.
- Raffatellu, M., George, M.D., Akiyama, Y., Hornsby, M.J., Nuccio, S.-P., Paixao, T. a, Butler, B.P., Chu, H., Santos, R.L., Berger, T., Mak, T.W., Tsois, R.M., Bevins, C.L., Solnick, J.V., Dandekar, S., y Bäumlér, A.J. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell host & microbe*, 5(5) , 476–86.
- Ramakrishnan, G., Sen, B., y Johnson, R. (2012). Paralogous Outer Membrane Proteins Mediate Uptake of Different Forms of Iron and Synergistically Govern Virulence in *Francisella tularensis* tularensis. *The Journal of biological chemistry*, 287(30) , 25191–202.
- Ratledge, C. y Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. "ANNUAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY," 881–941.
- Redford, P., Roesch, P.L., y Welch, R.A. (2003). *degS* Is Necessary for Virulence and Is among Extraintestinal *Escherichia coli* Genes Induced in Murine Peritonitis. *Infection and Immunity*, 71(6) , 3088–3096.
- Robey, M. y Cianciotto, N.P. (2002). *Legionella pneumophila* feoAB Promotes Ferrous Iron Uptake and Intracellular Infection. *Infection and immunity*, 70(10) , 5659–5669.
- Rotger, R. y Casadesús, J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2(3) , 177–84.
- Ruby, T., McLaughlin, L., Gopinath, S., y Monack, D. (2012). *Salmonella*'s long-term relationship with its host. *FEMS microbiology reviews*, 36(3) , 600–15.
- Salcedo, S.P., Noursadeghi, M., Cohen, J., y Holden, D.W. (2001). Intracellular replication of *Salmonella* typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cellular microbiology*, 3(9) , 587–97.
- Salvail, H., Lanthier-Bourbonnais, P., Sobota, J.M., Caza, M., Benjamin, J.-A.M., Mendieta, M.E.S., Lépine, F., Dozois, C.M., Imlay, J., y Massé, E. (2010). A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34) , 15223–8.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsois, R.M., Kingsley, R.A., Garry Adams, L., y Bäumlér, A.J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, 3(14-15) , 1335–1344.
- Schauer, K., Rodionov, D. a, y Reuse, H. de (2008). New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the "tip of the iceberg"? *Trends in biochemical sciences*, 33(7) , 330–8.
- Schmieger, H. (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet*, 119(1) , 75–88.
- Shen, S. y Fang, F.C. (2012). Integrated stress responses in *Salmonella*. *International journal of food microbiology*, 152(3) , 75–81.
- Silva, C. a, Blondel, C.J., Quezada, C.P., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H.L., Toro, C.S., Zaldívar, M., Contreras, I., McClelland, M., y Santiviago, C. a (2012). Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. *Infection and immunity*, 80(2) , 839–49.
- Skaar, E.P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS pathogens*, 6(8) , e1000949.
- Smith, K.D. (2007). Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(10) , 1776–80.
- Sohaskey, C.D. (2008). Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *Journal of bacteriology*, 190(8) , 2981–6.
- Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedrosa, E., y Lasa, I. (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19) , 7997–8002.
- Sonck, K. a J., Kint, G., Schoofs, G., Vander Wauven, C., Vanderleyden, J., y Keersmaecker, S.C.J. De (2009). The proteome of *Salmonella* Typhimurium grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics*, 9(3) , 565–79.

- Sorrell, J.M. y Caplan, A.I. (2009). Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *International review of cell and molecular biology*, 276(09) , 161–214.
- Spector, M.P., Garcia del Portillo, F., Bearson, S.M., Mahmud, a, Magut, M., Finlay, B.B., Dougan, G., Foster, J.W., y Pallen, M.J. (1999). The *rpoS*-dependent starvation-stress response locus *stiA* encodes a nitrate reductase (*narZYWV*) required for carbon-starvation-inducible thermotolerance and acid tolerance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 1, 3035–45.
- Srikanth, C.V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., y McCormick, B.A. (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(22) , 3687–97.
- Stecher, B., Paesold, G., Barthel, M., Kremer, M., Jantsch, J., Stallmach, T., Heikenwalder, M., y Hardt, W.-D. (2006). Chronic *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Induced Colitis and Cholangitis in Streptomycin-Pretreated Nrp1^{+/+} Mice. *Infection and Immunity*, 74(9) , 5047–5057.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Current opinion in microbiology*, 11(1) , 38–45.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbé, J., y Campoy, S. (2011). Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the hliD operator in vivo and in vitro. *PLoS one*, 6(5) , e19711.
- Thompson, A., Rowley, G., Alston, M., Danino, V., y Hinton, J.C.D. (2006). *Salmonella* transcriptomics: relating regulons, stimulons and regulatory networks to the process of infection. *Current opinion in microbiology*, 9(1) , 109–16.
- Thompson, C.C., Nicod, S.S., Malcolm, D.S., Grieshaber, S.S., y Carabeo, R. a (2012). Cleavage of a putative metal permease in *Chlamydia trachomatis* yields an iron-dependent transcriptional repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26) , 10546–51.
- Thompson, L.J., Dunstan, S.J., Dolecek, C., Perkins, T., House, D., Dougan, G., Nguyen, T.H., Tran, T.P.L., Doan, C.D., Le, T.P., Nguyen, T.D., Tran, T.H., Farrar, J.J., Monack, D., Lynn, D.J., Popper, S.J., y Falkow, S. (2009). Transcriptional response in the peripheral blood of patients infected with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52) , 22433–8.
- Thornbrough, J.M., Hundley, T., Valdivia, R., y Worley, M.J. (2012). Human Genome-Wide RNAi Screen for Host Factors That Modulate Intracellular *Salmonella* Growth. *PLoS one*, 7(6) , e38097.
- Thöne, F., Schwanhäusser, B., Becker, D., Ballmaier, M., y Bumann, D. (2007). FACS-isolation of *Salmonella*-infected cells with defined bacterial load from mouse spleen. *Journal of microbiological methods*, 71(3) , 220–4.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., y Euzéby, J.P. (2005). Taxonomic Note Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 521–524.
- Troxell, B., Fink, R.C., Porwollik, S., McClelland, M., y Hassan, H.M. (2011). The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *BMC microbiology*, 11(1) , 236.
- Troxell, B., Sikes, M., Fink, R., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., y Hassan, H. (2011). Fur negatively regulates hns and is required for the expression of HliA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 193(2) , 497–505.
- Tsolis, R.M., Bäumlér, a J., Heffron, F., y Stojiljkovic, I. (1996). Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infection and immunity*, 64(11) , 4549–56.
- Tsolis, R.M., Bäumlér, a J., Stojiljkovic, I., y Heffron, F. (1995). Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *Journal of bacteriology*, 177(16) , 4628–37.
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D., y Groisman, E.A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *The EMBO journal*, 18(14) , 3924–33.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., y Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26) , 15264–9.
- Valdez, Y., Grassl, G. a, Guttman, J. a, Coburn, B., Gros, P., Vallance, B. a, y Finlay, B.B. (2009). Nrp1 drives an accelerated inflammatory response during *Salmonella*-induced colitis in mice. *Cellular microbiology*, 11(2) , 351–62.

- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., y Fang, F.C. (2000). Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 192(2) , 227–36.
- Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K.L., y Fang, F.C. (2007). The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular microbiology*, 63(5) , 1495–507.
- Vidal, S., Gros, P., y Skamene, E. (1995). Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. *Journal of leukocyte biology*, 58(4) , 382–90.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., y Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3) , 469–85.
- Vogel, H.J. y Bonner, D.M. (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem*, 218(1) , 97–106.
- Weinberg, E.D. (2000). Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2(1) , 85–9.
- Williams, P.H., Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschäpe, H., y Reissbrodt, R. (2006). Catecholate receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine*, 24(18) , 3840–4.
- Winfield, M.D. y Groisman, E.A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 69(7) , 3687–94.
- Zhou, D., Hardt, W.D., y Galán, J.E. (1999). *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infection and immunity*, 67(4) , 1974–81.
- Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G., y Hantke, K. (2005). Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7) , 2363–72.
- Zúñiga, M., Pérez, G., y González-Candelas, F. (2002). Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 25(3) , 429–44.

ANEXO I

Tablas de estirpes, plásmidos y oligonucleótidos

Tabla A1. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 1 de resultados. Todas las estirpes son derivados isogénicos de la estirpe SV5015.

Estirpe	Genotipo	Referencia
SV5015	SL1344 His+	J. Casadesús
MD1026	$\Delta STM1499::kan$	Este trabajo
MD1028	$\Delta eutR-S::kan$	"
MD1030	$\Delta STM4466-STM4467::kan$	"
MD1032	$\Delta ygdED-gcvA::kan$	"
MD1034	$\Delta STM0054-STM0056::kan$	"
MD1036	$\Delta yidYZ::kan$	"
MD1038	$\Delta STM4204-STM4206::kan$	"
MD1040	$\Delta yhcK::kan$	"
MD1042	$\Delta nirB-nirD::kan$	"
MD1044	$\Delta yhjV::kan$	"
MD1046	$\Delta fpr::kan$	"
MD1048	$\Delta STM0279::kan$	"
MD1050	$\Delta ushA::kan$	"
MD1052	$\Delta STM0581::kan$	"
MD1054	$\Delta STM1020::kan$	"
MD1058	$\Delta STM3558-yhhV::kan$	"
MD1060	$\Delta ibpB::kan$	"
MD1062	$\Delta aidB::kan$	"
MD1064	$\Delta STM0717-STM0718::kan$	"
MD1066	$\Delta STM0719-STM0721::kan$	"
MD1068	$\Delta dmsABC::kan$	"
MD1070	$\Delta pduF-yeeX::kan$	"
MD1072	$\Delta glpQTABC::kan$	"
MD1074	$\Delta ego-STM4080::kan$	"
MD1076	$\Delta pspEDCBAF::kan$	"
MD1078	$\Delta yebGFE::kan$	"
MD1086	$\Delta ybhO::kan$	"
MD1090	$\Delta STM2139, 2n::kan$	"
MD1092	$\Delta STM0761-0762::kan$	"
MD1094	$\Delta narZYWV::kan$	"
MD1096	$\Delta narGHJI::kan$	"
MD1098	$\Delta STM1792-STM1794::kan$	"
MD1100	$\Delta acpT::kan$	"
MD1965	$\Delta dgoT::kan$	"

MD1982	$\Delta narZYWV \Delta narGHJ::kan$	Este trabajo
MD1990	$\Delta napFDAGH::cat$	"
MD1991	$\Delta narZYWV \Delta narGHJ::kan \Delta napFDAGH::cat$	"

Tabla A2. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 2.1 de resultados. Todas las estirpes son derivados isogénicos de la estirpe SV5015.

Estirpe	Genotipo	Referencia
SV5015	SL1344 His+	J. Casadesús
MA10839	<i>chiP</i> ::3xFLAG- <i>kan</i> LT2	L. Bossi
MA10840	<i>chiQ</i> ::3xFLAG- <i>kan</i> LT2	L. Bossi
MD2635	<i>chiP</i> ::3xFLAG- <i>kan</i> SL1344	Este trabajo
MD2636	<i>chiQ</i> ::3xFLAG- <i>kan</i> SL1344	"
MD2637	$\Delta chiX::cat$ <i>chiP</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>	"
MD2640	$\Delta chiX::cat$ <i>chiQ</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>	"

Tabla A3. Estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium empleadas en este trabajo, comentadas en el capítulo 2.2 de resultados. Todas las estirpes son derivados isogénicos de la estirpe SV5015.

Estirpe	Genotipo	Referencia
SV5015	SL1344 His+	J. Casadesús
SV4056	<i>phoP7953::Tn10</i>	(García-del Portillo <i>et al.</i> , 1999)
MD1979	$\Delta sitABCD$	Este trabajo
MD1980	$\Delta sitABCD \Delta iroBCDEN::kan$	"
MD1993	$\Delta fepA::cat$	"
MD1997	$\Delta cirA::kan$	"
MD1998	$\Delta iroBCDEN$	"
MD1999	$\Delta iroBCDEN \Delta fepA::cat$	"
MD2000	$\Delta iroBCDEN \Delta fepA::cat \Delta cirA::kan$	"
MD2602	$\Delta feoABC::kan$	"
MD2604	$\Delta fepCGD$	"
MD2612	$\Delta foxA::kan$	"
MD2614	<i>iroN</i> ::3xFLAG- <i>kan</i>	"

MD2616	<i>fepA::3xFLAG-kan</i>	Este trabajo
MD2618	<i>cirA::3xFLAG-kan</i>	"
MD2620	<i>feoB::3xFLAG-kan</i>	"
MD2622	<i>sitD::3xFLAG-kan</i>	"
MD2623	$\Delta fhuABCD$	"
MD2624	$\Delta fhuE$	"
MD2627	$\Delta iroBCDEN \Delta cirA$	"
MD2629	<i>fepA::3xFLAG-kan</i> $\Delta phoP7953::Tn^{10}$	"
MD2642	$\Delta sitABCD \Delta feoABC::kan$	"
MD2643	$\Delta sitABCD \Delta feoABC::kan \Delta fepCGD::cat$	"
MD2645	<i>fepA::2-HA::3xFLAG-kan</i>	"
MD2646	<i>fepA::1-HA::3xFLAG-kan</i>	"
MD2648	$\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD$	"
MD2649	$\Delta sitABCD \Delta feoABC \Delta fepCGD \Delta fhuACDB::kan$	"
MD2650	<i>fepA^{Δ30-100}::3xFLAG-kan</i>	"
MD2651	<i>fepA^{Δ30-100}</i>	"
MD2652	<i>fur::3xFLAG-kan</i>	"
MD2654	<i>fur::3xFLAG fepA::3xFLAG-kan</i>	"
MD2655	$\Delta iroBCDEN \Delta cirA fepA::1-HA::3xFLAG-kan$	"
MD2656	$\Delta iroBCDEN \Delta cirA fepA^{\Delta 30-100}::3xFLAG-kan$	"
MD2659	$\Delta iroBCDEN \Delta cirA fepA::3xFLAG-kan$	"
MD2660	$\Delta iroBCDEN \Delta cirA fepA::2-HA::3xFLAG-kan$	"
MD2661	$\Delta degS::kan$	"
MD2662	$\Delta sohB::kan$	"
MD2664	<i>fepA::3xFLAG</i> $\Delta degS::kan$	"
MD2665	<i>fepA::3xFLAG</i> $\Delta sohB::kan$	"
MD2666	<i>fepA::3xFLAG</i> $\Delta rpoE::kan$	"

Tabla A4. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 $\Delta lacU189$ ($\Phi 80d lacZ \Delta M15$)</i>	(Hanahan, 1983)
XL-1 Blue	<i>recA1 gyrA96 relA1 endA1 hsdR17 supE44 thi1 lac [F' proAB lac]^q lacZDM15 Tn10] Tc^r</i>	Startagene

Tabla A5. Plásmidos empleados.

Plásmido		Referencia
pKD3	Cm ^r , Amp ^r	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD4	Kn ^r , Amp ^r	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD13	Kn ^r , Amp ^r	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD46	γ , β , <i>exo.</i> Amp ^r	(Datsenko y Wanner, 2000)
pSUB11	secuencia 3xFLAG, Kn ^r	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pKO3 Blue	pKO3:: <i>lacZ</i> , Cm ^r	(Solano <i>et al.</i> , 2009)
pCP20	FLP ⁺ , Amp ^r , Cm ^r	(Cherepanov y Wackernagel, 1995)
pGEMt	Amp ^r ,ori f1, <i>lacZ</i> :: <i>mcs</i>	Plasmid pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)

Tabla A6. Oligonucleótidos empleados para la disrupción de genes cromosómicos.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Plásmido molde
STM0056-STM0054 P1	CAGAAAAAATTTGGATGAAAAATGGGATACGACATCGTATCCACTCCACTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0056-STM0054 P4	GAAGTTGTGTCAGAGCCACCCTGCTCTCATTATGAAAAATGATTCATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM1499 P1	TTGCAAAACGGGAGCTCCGGGCGGTAAACACGTCCCGAGACGCGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM1499 P4	ATTCGTTATAGTTATCAATATATAGCGAAATAATACGACAATGAGTGAGTGAAATCCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
eutR-S P1	AATTCGACACGCGCACGTTATCAGCAACCGGAGAGCCTCCCATCATATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
eutR-S P4	TCCGACAAAAAATGCCACGATGACGGCAGTTTCAGTGGAGACGGTGAGCAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM2981 P1	AAGCGTGCATCCGGCGCTGATGACGCGCGGACGACGGCAACGCGTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
STM2981 P4	TACATGTTGTACCTATTTGTTAAATTCATTGACATTAAAGTCCAGAGGCCATCCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM3847 P1	TCGCGCAACATCGCCCGTATCTTAGGCCACACTTTTCGTAGGCCGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM3847 P4	CAGATGGTGACATTTCTGTAAGAGGAAGGTTAATTTATCAACGCAGGTGGATTCCGGGGATCCGTCGACC	
STM4205 P1	CTGTGTTGATGCACATTTGTTAAATGGGAAGATCGCGTTTTACGTAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM4205 P4	CTCAGTTTTGCTGGTAGACTTCGCTGAATTACAACCTTCTTGATTGCTATAATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM4467 P1	TGCGCGCTCTGTAGCCGAATAAGGCGGAAGCCGCCATCCGTTAAAGGCCGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM4467 P4	TATTTGCAGCCACTCTTCTTATTTCTGTAATTATGTAAAGGTATAATGATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM3340 P1	AACGCTTATAGTCCGATCTTCACTAAAACGGGATCGGAGGTGCGATCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
STM3340 P4	TAAAGCTGTTACGATAAGCTTGTCTATTATTTGCCACCGACCACTCATGAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM3475 P1	GGTTGCTGAATCGTTAAGGTAGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGCAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
STM3475 P4	AAAATGAAAAAATAACAAAAAGGGAGGCGTTGCGCTCCCAAAATAAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM3558 P1	CGGCGCACATGCCGTAAACCAACAGGCGAGCGTCGCCGGGATTAAGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
STM3558 P4	GCTCTTTTTTGTACATGTTTGTGTACAATAAACATGTACAACCTGGGGAGATTCCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM3625 P1	TAGGCAGCATTTTATGAGAGAGCTGCGTATATTTGGGCAGGGGGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
STM3625 P4	CCTGTAGGCTGTAAAGCGTAGCGCCACCGGGCATGGCTCTCCGGTACGACATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13

Tabla A6. (continuación)Oligonucleótidos empleados para la disrupción de genes cromosómicos.

STM4084 P1	TTGGTGATGATTTGCAGGCCGGATAAGCCCAAGCCCGCATTCGGTAAACACAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM4084 P4	TTTCTCTGACGAACGAAGATAAGTTAGCGATTAGAAACAGGAGAAACCAATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0279 P1	ATAAGCAGATAAATCAGGGCTTAATTTAGGTAGTTAAAGGATAGTAGTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0279 P4	AATCAAAATAATAATCCGGCCAGATATAAATCTGGCCGAAAAACAGCCGATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0494 P1	ATTGCAAGGAAGGTAATTTCTGCGGTTGATATTGAGTCAGGGAGAGAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0494 P4	CCGTAGGCCTTAAGTTGCGCGCCATCAGGCAGAAATGGCTATCCGTACCGATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0581 P1	TAAATGTGCGGTGCGGGAGCCGTGACGAGTTTGATAGAGGGAGAGCACCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0581 P4	TTTCAATGCGTACGGCCATGCTTTCTTTACGATAAGCGCCTGGCGCAGGATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0717 P1	GCAGAATTACCCTGCGGCAGGAGCATGTACTACGAGGGGACTGACGGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0717 P4	GAAACGCAACATTATGGGCTGTAATACCGCGGCATGATGTAATAATGCTGATTCGGGGATCCGTCGAC	
STM0719 P1	TGGATAAACTATCTAATATTATCTGTCTGCAACACAGAGTGACAAAATAGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0719 P4	TTACATACTAATTTATAAACACTGACCTACTTCATAAGCACTTTATGGTGATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0812 P1	GCGAGCAGGGCGCGATAATCGTGCTTGCGACGTATGTTGCCGCCAGCGGTGAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0812 P4	TGACGACGACTACATTTCAATCAGGATAGTGACGCGGACAGGAAGAAATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM0965 P1	TCATACATCGTTTTATTGTTTTTTATTGTGAGCAGCAGAGTGAGCCCTTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0965 P4	TAAAGCGGAATTCGGCTGCAGTTCTGCAGGCCGAATGCGGTCACGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC	
STM1020 P1	CACTGGCCTGAACAAACAGTAACCTGACAATTATGCGCCACGAGAAATACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM1020 P4	CCGTGCTGTTGTGCAGTCGTGATGATGAACAGGAGTATTTTCATCGCAATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM2054 P1	TCTCACCTGTTTTACGATACATCATTTGCTGTGAATCTGTTTCGATTTCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM2054 P4	CACTAGCAGTTGCTTAACGAATCCGAATCTCACATTATCAGGGGTGTAATAATTCGGGGATCCGTCGACC	
STM2285 P1	ATGAGGCGTTTATGCCCTCATCCGGCGGTCACCTTCGACTATGGCAACCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM2285 P4	CGTCCCTGTGTAGTAGGGTAATGGCGCGGAGGGGCTCCGGCGCTTTTACATTTCCGGGGATCCGTCGACC	
STM3808 P1	GTGGCATAAAAAAAGCCCGCCATCTCTGGCGGGCAAGGCAAGGAGCTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM3808 P4	CGCACGTAAAGTGAAGGTAAAACTCGCTTCTTAGAAGGAGAAATGATTATTCGGGGATCCGTCGACC	

Tabla A6. (continuación) Oligonucleótidos empleados para la disrupción de genes cromosómicos.

STM4075 P1	AAAAAACATTTTGTTCAGTCCCGTCAGTCAACATTGAGGGAGCGGAGGCAACGTTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM4075 P4	ACCAGCCGAGTGTCTATGTAGGCCTGATAAGGTAAAGCCGCCATCCGGCATATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM4377 P1	GCGCAGTCATGACCATACTTGACTTCAGCGCCATTGAAGGAGGAGACACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM4377 P4	GCCGGATGGCATGTACTACAGGTCAAACGTTACCGCAGTCCCGCGTCGCCATTCCGGGGATCCCGTCGACC	pKD13
pspE-F P1	CAACGGCGCATTAAGCGCGCGTTAGTATGATGATTGAGCAATAGATTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
pspE-F P4	AAATGTCGGTGGATAAATGGCGTAAATGTCGTAATTAGCCGGAGAAATAGATTCCGGGGATCCCGTCGACC	pKD13
yebE-G P1	GGAAAAGACACGCATGATGCAAGCGAAACATGTTACTTAAATGGCAGGTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
yebE-G P4	GCTGCCCTTGCAATATACTGTATATAAACACAGCTAAATAAGGGGCTGCAAAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
sitA-D P1	AGCAAAGGCTATATTCGATGATTAATTAACACATGTTGCGAGGATACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
sitA-D P4	GACTACTCTATATTATGACCGTATGTTTCTCTGAATAGCAGCAAAAGATTCCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
IroB-N P1	ATTCTCAATTAACGACTTGTTCGATTTATGACGTGGAGAGAGGATTTCTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
IroB-N P4	CAAGGATGTAGCTTGAGGGCAACAGCGCTACTTTAGACATTATTTAGGGAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM2139,2n P1	ATCGGAAAGCGTCTGACTACCCCTTGTGATTTCTCTTGCACTCTCAAGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM2139,2n P4	CCAGAAAGTGATAGCAGAAATGAAAAAGCGAGGTGAGAACAGGATGAAAAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM0761-62 P1	ATTGGTCCGGTAACAGCCTACCGGACCGGTATTACCAATATTAATGTAATGTTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM0761-62 P4	ATGAAAATGTGATCAATGGATAAAACAATGCAACATAGCACTGGAGGAGTATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
narZYWV P1	AAGCCAAATCGACAGGATGGCGAAAAATTTATCGAAGCAGAGAGAAATGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
narZYWV P4	ACGCCAGGCGTTTTTCTTTGCCGGTAAGCGTATCCCGGGCAAGAGAAAAATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
narJHG P1	ACGCCATAAAAAAACTCCGCCGAAGCGGAGTTTAGGGCATCGAGAGAAAAAGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
narJHG P4	AGCAATGTCGATTTATCAGAGAGCCGTAAGGTTCCACACAGGAGAAACCCGATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
STM1792-93-94 P1	GAGTCCGGTACTGATTAGCTTTTACTCTCTTCTGCTACAGGAGTTAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
STM1792-93-94 P4	AAAAAGATAAAAAACCGGAGTCAGACGCGCTGACCCCGGTTTAACTCTATTCGGGGATCCGTCGACC	pKD13
acpT P1	GGCGACAGATGCTACAATCTCTCTTTCATAGGCAACGTTGGTCTGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
acpT P4	AGTCCGCAATTTGTAAACACACGCTCCGCCCGCCAGAGGAAAAAATTAATGTATTCCGGGGATCCGTCGACC	pKD13

Tabla A6. (continuación) **Oligonucleótidos empleados para la disrupción de genes cromosómicos.**

dgoT P1	GGATAGCCGGTCACTCTTCGCCATAATGACTTCGGGCTCGCCACGGCAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
dgoT P4	CCGGCAACCCAAATTTAAATATATAAAAAACACACCCTCTGTAATTTACAGGGCATTCGGGGATCCGTCGACC	
napFDAGH P1	TTATTGGTATTCACTCCCTATGGAAGCGTGTCTATGGAAGGGCGATATCGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD3
napFDAGH P2	GCTCGAAAAATCCAGTCAATCGTTATCTATGCTCCGGGGATTTCCTCGCCATATGAATATCCTCTTAGT	
fepA P1	GCCTTTGACGGGCGCTTTGGCTTATGTGGCTAAAGAAAAAGCAGGATATACAGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD3
fepA P2	AGGTGTACGCCCGCAGCGCCCGCATATAAGCGCAGTTTGCATCCCTGACATATGAATATCCTCTTAGT	
fepCGD P1	CGATAATTACTATATATCAGGGAAGTTACTATGTGTCGCTCTTTTCCGGGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD3
fepCGD P2	TTACCCGAAAAAGCCGGATAGCGATATCCGGCTTTGTGTCATAGTGTGGCGACATATGAATATCCTCTTAGT	
cirA P1	TTGTGAGCGATAACCGGATTTTTTTGTCTGTAATTTACCTCATGGAATAATGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD3
cirA P4	GTTTATAACATTCTGGCAGACAGCGCAAAACCGGCTGTCCGACGTCTCTGATTCGGGGATCCGTCGACC	
fpoAB P1	CTGAGCGCCGATGAGGTATACATCCAGTTAGTAAGAAACAAGTAGGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
fpoAB P4	AACGCGGATAAAGGCCGGATAAGACGCGTTACGTGCTACCCGACGAAGGATTCCGGGGATCCGTCGACC	
fhuACDB P1	TAATAATAATTATCGTTTACGTTATCATTCACTTTTCATCAGAGATATACCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
fhuACDB P4	GGTCGGGTTGAGCATGGCTGCCACCGACATAAATGTGGCAGAGCTTTTATTTCGGGGATCCGTCGACC	
fhuE P1	ATTCCGGCTGCCTTTTTTAATGGCGCTTACATGCCGCTCTCCGACAGTCTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
fhuE P4	TTCAACGTATACGTCCTGAACCTTACCCCAATAACAAGCAAGGATTTTCAGATTCGGGGATCCGTCGACC	
foxA P1	GCATAGTGGTCCGTCATCTCTAAAAGGTAATAATTTCTTATTACATAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
foxA P4	CTACCGGACGATAGCGTTATCAAAACGCCCATGACAGGCTGCTACAAATGATTCGGGGATCCGTCGACC	
FepA-T Fw (a)	CGCGGATCTCCGGCAATACGCGCCATCG	
FepA- T Rv (b)	TCGCGTTCCCGCGCCAGCCATCGGTTTTGTCTCCGCCATCACGGGCGAG	pKO3 Blue
FepA-T Fw (c)	TGGCGGAAGACAAAACCGATGGCTGGCGGGCGGAACGCGATACCCGCGGC	
FepA-T Rv (d)	CGCGGATCCTTCTGAGTATCGCCGGCATA	
shoB P1	CGGATGGCGTGAATGCCATCCGGCAATAGCGGTTTATACATAACGGCTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
shoB P4	TGCCTGTTGTACACTGAGCGCAAGTCGCGTTATTATCAAGGTGGGAGTCATTCGGGGATCCGTCGACC	

Tabla A6. (continuación) Oligonucleótidos empleados para la disrupción de genes cromosómicos.

degS P1	GCCGTTCCTTTTAAACGACGCCCTCCATCATGTTTGTGAAGCTCTTACGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	pKD13
degS P4	CGGGCAAAAGCCGCGTCGTTTGTAGTCGACGCCGGGTATTCCTGCACCCGTCATTCCGGGGATCCGTCGACC	

Tabla A7 Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de genes cromosómicos.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Plásmido molde
iroN FLAG (fw)	ACGGGGGGGGCTTATTATGCCGGTGTGACGGCCTCGTTT GACTACAAAGACCATGACGG	pSUB11
iroN FLAG (rv)	CCGCCGCCAGAAATATGCCCGCAGCGCGGCATAATCCA CATATGAATATCCTCCTTAG	
fepA FLAG (fw)	ACCAGGACGTACGTGTATATGAGCAATTATACCAATTC GACTACAAAGACCATGACGG	pSUB11
fepA FLAG (rv)	TTGCCAATTCCCTCCCGAATGAGGGAGGGAAGTTGCCA CATATGAATATCCTCCTTAG	
cirA FLAG (fw)	AGACGGACGTCGTTACTTATGGCGGTGGATTACCGTTTCGACTACAAAGACCATGACGG	pSUB11
cirA FLAG (rv)	TCTGGCGACAG CGGCAAAACGGGCTGTCCAGTCTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG	
sitABCD FLAG (fw)	GCGCGACAGGCGTAATGAAATCGTACCAAGGCGCAAGGTGACTACAAAGACCATGACGG	pSUB11
sitABCD FLAG (rv)	ATTATGACCGTATGTTTCTGAATAGCAGGCAAAAAAGTG CATATGAATATCCTCCTTAG	
fepB FLAG (fw)	CGTCAGTTCTCTGTTG TTCGGGCACTGCGGGCAATTTTACATCCC CATATGAATATCCTCCTTAG	pSUB11
fepB FLAG (rv)	GATCGCGAACCTGTATCAATGAAGCCATTTTACATCCC CATATGAATATCCTCCTTAG	
HA FepA 1 Fw (c)	CCGTACCAGCCGTAACCTCGAGCATAATCAAGGAACATCATACGGATAGTGCCTGGGCTGGCGCGG	pKO3 Blue
HA FepA 1 Rv (b)	CCGCCCGAGCCCGGCGCACTATCCGTATGATGTTCTCTGATTATGCTCGAGTTACGGCTGGTGACGG	
HA FepA 2 Fw (c)	TGCCGCCGGAGATGATCGAAAGCATAATCAGGAACATCATACGGATACGCATTGAAGTGCTGCGTGG	pKO3 Blue
HA FepA 2 Rv (b)	CCACGCAGCACTTCAATGCGTATCCGTATGATGTTTCTGATTATGCTTTCGATCATCTCCGGCGGCA	
HA FepA Fw (a)	CGCGGATCCCATTTGCAATAGCGTA	pKO3 Blue
HA FepA Rv (d)	CGCGGATCCGCCCTGGCGACTGTATC	
fur FLAG (fw)	CTGCCCGGAAAGACGAGACGCGCGCAGCATGACGCGACTAAAGACTACAAAGACCATGACGG	pSUB11
fur FLAG (rv)	AAAAGCCAAACGGGCGGTTGGCTCTTCGAAAGATTTACACCATATGAATATCCTCCTTAG	

BIBLIOGRAFÍA

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4) , 557-80.
- García-Del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., y Casadesús, J. (1999). DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20) , 11578-83.
- Datsenko, K. a y Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12) , 6640-5.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., y Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26) , 15264-9.
- Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedroso, E., y Lasa, I. (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19) , 7997-8002.
- Cherepanov, P.P. y Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1) , 9-14.

ANEXO II

Genes seleccionados

A continuación se detallan los genes pertenecientes a cada grupo que fueron seleccionados a partir de los análisis de transcriptómica obtenidos en la Tesis Doctoral de Cristina Nuñez (Nuñez-Hernandez, 2008). Las características de los grupos (I-IV) son las siguientes:

Grupo I: genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular, al menos cuatro veces ($M \geq 2$) y en los duplicados del microsoporte.

Grupo II: genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular, al menos tres veces ($M \geq 1,5$) y en los duplicados del microsoporte.

Grupo III: genes inducidos **exclusivamente** en la estirpe silvestre intracelular, al menos cuatro veces ($M \geq 2$) y en uno de los duplicados, mientras que el otro duplicado presentaba valores de expresión relativa superior a 1.

Grupo IV: genes inducidos al menos 4 veces ($M \geq 2$) tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *phoP*.

Los nombres de los genes que aparecen en las tablas han sido tomados directamente de la base de datos del genoma de la estirpe LT2 (McClelland et al., 2001).

Tabla A8. Genes de *S. enterica* serovar Typhimurium del grupo I.

GRUPO I		
Nombre del gen		Función
STM0054		Probable oxalacetato descarboxilasa, subunidad β
STM0056		Probable oxalacetato descarboxilasa, subunidad γ
STM0111	<i>leuC</i>	Isopropil-malato isomerasa, subunidad grande
STM0279		Probable proteína citoplasmática
STM0339	<i>stbB</i>	Probable chaperona de fimbrias
STM0494	<i>ushA</i>	UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa
STM0548	<i>fimF</i>	Probable proteína de fibria
STM0561		Kinasa sensora
STM0581		Probable proteína reguladora
STM0662	<i>gltL</i>	Transportador glutamato/aspartato
STM0688	<i>ybfN</i>	Probable lipoproteína
STM0717		Proteína de membrana interna
STM0719		Probable UDP-galactopiranososa mutasa
STM0766	<i>dcoC</i>	Probable oxaloacetato descarboxilasa, subunidad γ
STM0812	<i>ybhO</i>	Cardiolipina sintetasa
STM0965	<i>dmsB</i>	Dimetil sulfóxido reductasa anaeróbica, subunidad β
STM1020		Proteína hipotética STM1020
STM1021		Proteína hipotética STM1021
STM1041		Probable proteína menor de la cola del bacteriofago
STM1048		Proteína J de rango de hospedador
STM1091	<i>sopB</i>	Proteína efectora
STM1246	<i>pagC</i>	Proteína de membrana de virulencia precursora de PAGC
STM1297	<i>selD</i>	Selenofosfato sintetasa
STM1499		Probable dimetil sulfóxido reductasa, cadena A1
STM1585		Probable lipoproteína de membrana externa
STM2054	<i>pduT</i>	Proteína de cuerpo polihédrico
STM2139,2n		Proteína hipotética STM2139,2n
STM2285	<i>glpB</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa anaeróbica, subunidad B
STM2383	<i>mepA</i>	Endopeptidasa mureínica insensible a penicilina
STM2461	<i>eutG</i>	Probable proteína transportadora
STM2470	<i>eutS</i>	Probable proteína estructural del carboxisoma
STM2586		Similar a la proteína de ensamblaje de la cola del bacteriofago
STM2632		Proteína similar a la exodesoxiribonucleasa VIII
STM2634		Probable proteína citoplasmica
STM2735		Proteína hipotética STM2735
STM2892	<i>invJ</i>	Proteína controladora de la longitud de la aguja
STM2981	<i>ygdD</i>	Proteína hipotética STM2981

STM3060	<i>ygfE</i>	Probable proteína citoplasmica
STM3106	<i>ansB</i>	L-asparaginasa periplásmica II
STM3352	<i>oadA</i>	Oxaloacetato descarboxilasa
STM3475	<i>nirD</i>	Nitrite reductasa, subunidad pequeña
STM3558		"death-on-curing protein"
STM3640	<i>lpfA</i>	Proteína de fibria lpf A
STM3764	<i>mgtC</i>	Proteína transportadora de Mg ²⁺
STM3808,S	<i>ibpB</i>	Proteína pequeña de estrés por calor
STM3815	<i>ccmE</i>	Peroxidasa periplásmica hemo-dependente
STM3823	<i>torC</i>	Trimetilamina N-óxido reductasa, subunidad similar al citocromo c
STM3847	<i>yidY</i>	Probable proteína de transporte
STM4075	<i>ydeY</i>	Probable proteína de transporte de azúcar
STM4084	<i>fpr</i>	Ferredoxin-NADP reductasa
STM4147	<i>secE</i>	Translocasa
STM4205		Probable glicosiltransferasa de bacteriófago
STM4319	<i>phoN</i>	Ácido-fosfatase no específica
STM4356	<i>yjeF</i>	Probable kinasa de azúcar
STM4377	<i>aidB</i>	Probable acyl-CoA deshidrogenasa
STM4467		Probable arginina desiminasa

Tabla A9. Genes de *S. enterica* serovar Typhimurium del grupo II.

GRUPO II		
Nombre del gen		Función
STM2751		Probable enzima específica de glucitol
STM2793	<i>gabP</i>	Proteína transportadora de γ -aminobutirato transport protein
STM2816		Probable glicoporina
STM3038		Probable metaloendopeptidasa
STM3131		Probable proteína citoplasmática
STM3237	<i>yhaL</i>	Probable proteína citoplasmática
STM3340	<i>yhck</i>	Regulado transcripcional NanR
STM3625	<i>yhjV</i>	Probable proteína transportadora
STM3763	<i>mgtB</i>	Transportador de Mg ²⁺
STM3796A,S		Proteína integral de membrana
STM3854	<i>pstB</i>	Transportador de fosfato de alta afinidad
STM4106	<i>katG</i>	Hidropoxidasa
STM4185	<i>aceK</i>	Proteína bifuncional isocitrato deshidrogenasa kinasa/ fosfatasa
STM4199		Probable proteína citoplasmática

STM4315		Probable proteína de unión a ADN
STM4400	<i>ytfF</i>	Probable transportador de aminoácidos catiónicos
STM4427		Probable endonucleasa
STM4433		Myo-inositol 2-deshidrogenasa
STM4488		Probable integrasa

Tabla A10. Genes de *S. enterica* serovar Typhimurium del grupo III.

GRUPO III		
Nombre del gen		Función
STM0074	<i>caiT</i>	Antiporter L-carnitina/ γ -butirobetaina
STM0171	<i>yadF</i>	Probable anhidrasa carbónica
STM0502	<i>ybbL</i>	Probable sistema de transporte tipo ABC azucar/spermidina/putrescina
STM0700	<i>potE</i>	Antiporter putrescina/ornitina
STM0761		Fumarato hidratasa
STM1539		Probable hidrogenasa, subunidad pequeña 1
STM1568	<i>fdnI</i>	Formato deshidrogenasa-N, subunidad γ
STM1577	<i>narZ</i>	Nitrato reductasa 2, subunidad α
STM1731		Probable catalasa
STM1764	<i>narG</i>	Nitrato reductasa 1, subunidad α
STM1786		Hydrogenasa 1, subunidad pequeña
STM1793		Probable citocromo oxidasa, subunidad II
STM2039	<i>pudB</i>	Proteína de cuerpo polihédrico
STM2102	<i>wzx</i>	Probable exportador
STM2117	<i>wzb</i>	
STM2179		Probable transportador de azucar
STM2259	<i>napA</i>	Nitrato reductasa pariplásmica
STM2935	<i>cysD</i>	Sulfato adenilil transferasa, subunidad 2
STM3147	<i>hybC</i>	Hidrogenasa 2, subunidad grande
STM3150	<i>hypO</i>	Probable hidrogenasa Ni/Fe, subunidad pequeña
STM3337	<i>nanE</i>	Probable ManNAc-6P epimerasa
STM3583	<i>acpT</i>	Probable fosfopantetenil transferasa
STM3614	<i>dctA</i>	Proteína transportadora de dicarboxilato C4
STM3661	<i>xylA</i>	Xylosa isomerasa
STM3827	<i>dgoT</i>	Proteína transportadora de D-galactonato
STM3952	<i>corA</i>	Proteína transportadora de $Mg^{2+}/Ni^{2+}/Co^{2+}$
STM4035	<i>fdol</i>	Formato deshidrogenasa O, subunidad γ
STM4230	<i>malk</i>	Represor/transportador de maltosa

STM4239		Proteína hipotética STM4239
STM4249	<i>aphA</i>	Ácido fosfatasa no específica/fosfotransferasa
STM4418		Transportador de azúcar
STM4494		Probable sistema de transporte tipo ABC de azúcar /spermidina/ putrescina
STM4515	<i>yjiJ</i>	Probable transportador de azúcar

Tabla A11. Genes de *S. enterica* serovar Typhimurium del grupo IV.

GRUPO IV		
Nombre del gen		Función
STM1088	<i>pipB</i>	Proteína efectora secretada
STM1398	<i>sseB</i>	Componente de la maquinaria de traslocación
STM1399	<i>ssaA</i>	Chaperona del sistema de secreción
STM1402	<i>sseE</i>	Proteína efectora secretada
STM1419	<i>ssaR</i>	Proteína del complejo de la jeringa
STM1686	<i>pspE</i>	Proteína de estrés por bacteriófago
STM1688	<i>pspC</i>	Proteína de estrés por bacteriófago
STM1689	<i>pspB</i>	Proteína de estrés por bacteriófago
STM1882	<i>yebG</i>	Proteína inducible por daño en el ADN
STM2621	STM2621	Proteína hipotética STM2621
STM2777	<i>iroN</i>	Receptor de sideróforo dependiente de TonB
STM2865	<i>avrA</i>	Proteína efectora secretada
STM2935	<i>cysD</i>	Sulfato adenililtransferasa, subunidad 2

BIBLIOGRAFÍA

- Núñez-Hernandez, C. (2008). Estudio de la Interacción *Salmonella*-Fibroblasto Mediante Transcriptómica: Caracterización de Respuestas Ligadas a la Atenuación del Crecimiento Intracelular del Patógeno. *Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias*.
- Oliveros, J.C. (2007). FIESTA at BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates (<http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA>).

